



TITLE:

インジウム-111標識ペプチド放射性薬剤におけるキレート形成部位の新規導入法の開発と腎臓での放射能挙動の制御に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

秋澤, 宏行

CITATION:

秋澤, 宏行. インジウム-111標識ペプチド放射性薬剤におけるキレート形成部位の新規導入法の開発と腎臓での放射能挙動の制御に関する研究. 京都大学, 2001, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2001-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r10738>

RIGHT:

インジウム-111 標識ペプチド放射性薬剤における
キレート形成部位の新規導入法の開発と
腎臓での放射能挙動の制御に関する研究

2001

秋澤 宏行

インジウム-111 標識ペプチド放射性薬剤における

キレート形成部位の新規導入法の開発と

腎臓での放射能挙動の制御に関する研究

目次	11
第1章 序論	14
第2章 研究の目的と意義	16
第3章 研究の経緯	18
第4章 研究の成果	21
第5章 結論	23
参考文献	25
第6章 謝辞	27
第7章 参考文献	29
第8章 参考文献	31
第9章 参考文献	33
第10章 参考文献	35
第11章 参考文献	37
第12章 参考文献	39
第13章 参考文献	41
第14章 参考文献	43
第15章 参考文献	45
第16章 参考文献	47
第17章 参考文献	49
第18章 参考文献	51
第19章 参考文献	53
第20章 参考文献	55
第21章 参考文献	57
第22章 参考文献	59
第23章 参考文献	61
第24章 参考文献	63
第25章 参考文献	65
第26章 参考文献	67
第27章 参考文献	69
第28章 参考文献	71
第29章 参考文献	73
第30章 参考文献	75
第31章 参考文献	77
第32章 参考文献	79
第33章 参考文献	81
第34章 参考文献	83
第35章 参考文献	85
第36章 参考文献	87
第37章 参考文献	89
第38章 参考文献	91
第39章 参考文献	93
第40章 参考文献	95
第41章 参考文献	97
第42章 参考文献	99
第43章 参考文献	101
第44章 参考文献	103
第45章 参考文献	105
第46章 参考文献	107
第47章 参考文献	109
第48章 参考文献	111
第49章 参考文献	113
第50章 参考文献	115
第51章 参考文献	117
第52章 参考文献	119
第53章 参考文献	121
第54章 参考文献	123
第55章 参考文献	125
第56章 参考文献	127
第57章 参考文献	129
第58章 参考文献	131
第59章 参考文献	133
第60章 参考文献	135
第61章 参考文献	137
第62章 参考文献	139
第63章 参考文献	141
第64章 参考文献	143
第65章 参考文献	145
第66章 参考文献	147
第67章 参考文献	149
第68章 参考文献	151
第69章 参考文献	153
第70章 参考文献	155
第71章 参考文献	157
第72章 参考文献	159
第73章 参考文献	161
第74章 参考文献	163
第75章 参考文献	165
第76章 参考文献	167
第77章 参考文献	169
第78章 参考文献	171
第79章 参考文献	173
第80章 参考文献	175
第81章 参考文献	177
第82章 参考文献	179
第83章 参考文献	181
第84章 参考文献	183
第85章 参考文献	185
第86章 参考文献	187
第87章 参考文献	189
第88章 参考文献	191
第89章 参考文献	193
第90章 参考文献	195
第91章 参考文献	197
第92章 参考文献	199
第93章 参考文献	201
第94章 参考文献	203
第95章 参考文献	205
第96章 参考文献	207
第97章 参考文献	209
第98章 参考文献	211
第99章 参考文献	213
第100章 参考文献	215
参考文献	217
秋澤 宏行	219

目 次

緒言	1
引用文献	5
第1章 キレート形成部位 DTPA のペプチドへの新規導入法の開発	9
第1節 ペプチドとの結合可能な部位を一つだけ有する DTPA 誘導体の開発	11
第1項 合成	11
第2項 結果と考察	14
第2節 新規 DTPA 誘導体を用いた DTPA 結合ペプチドの合成法の開発	16
第1項 合成	16
第2項 結果と考察	21
引用文献	25
第2章 ^{111}In -DTPA-octreotide およびその誘導体の腎臓における放射能挙動に関する検討	28
第1節 ^{111}In -DTPA-D-Phe ¹ -octreotide 投与後の腎臓における放射能挙動の検討	29
第1項 実験方法	30
第2項 結果	35
第3項 考察	41
第2節 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体での腎臓における放射能滞留	43
第1項 実験方法	44
第2項 結果	49
第3項 考察	57
引用文献	60

第3章 腎臓への放射能集積量を低減する ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体 . . .	63
第1節 酸性アミノ酸の導入により負電荷を付与した ^{111}In -DTPA-octreotide の腎臓への集積量の低減	63
第1項 実験方法	64
第2項 結果	66
第3項 考察	71
引用文献	74
結語	77
謝辞	79

緒 言

生理活性ペプチドは対応する受容体と高い親和性を有し、また、その受容体の異常な発現が、腫瘍などの疾患部位においてしばしば認められている。また、低分子量のペプチドを体内に投与した場合、速やかな組織への移行や血液中からの速やかな消失を示すと考えられる。このようなことから、近年、ペプチドを母体とする放射性薬剤が臨床核医学分野において幅広く応用されることが期待されている (1)。なかでも、インジウム-111 (^{111}In) で標識されたペプチド放射性薬剤は、 ^{111}In が核医学画像診断および内部照射治療に対して適した放射線を放出することから、その開発が強く望まれている (1-23)。ペプチドの ^{111}In 標識については、その受容体との親和性を損なわずに直接ペプチドと ^{111}In とを安定に結合させることが難しいことから、受容体との親和性に関与する部位とは独立して ^{111}In と安定にキレートを形成する部位を新たに分子内に導入する方法が検討され、これまでに、キレート形成部位として diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) を用いる方法が開発されている。DTPA 結合ペプチドの ^{111}In 標識は非常に簡便であり、得られた ^{111}In -DTPA 結合ペプチドは生体内で安定なキレートを維持し、また、母体ペプチドで観察された上腹部での放射能集積を低減し、そこでの診断精度を上げ、不要な放射線被曝を低減するなど、放射性薬剤として優れた性質を有する (18, 24, 25)。

これまでに、DTPA をペプチドへ導入する方法として、diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (cDTPA) をペプチドと反応させる方法が開発されているが (26)、この場合、DTPA 結合ペプチドの合成収率が低いことが問題となっている (3, 17, 27)。また、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドでは、標的組織だけでなく非標的組織である腎臓にも高い放射能が集積、滞留するため、診断精度の低下や不要な放射線被曝を引き起こすことが問題となっている (18, 24, 25)。

そこで、著者は、消化管ホルモン産生腫瘍などの腫瘍において高密度に発現するソマトスタチン受容体に対して高い親和性を有するペプチドである D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol (octreotide) (28) を対象として、DTPA 結合ペプ

チドの高収率な合成法、および ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの腎臓での非特異的な放射能集積を低減する方法の開発を計画した。

cDTPA はペプチドと結合可能な部位を二つ有するため、cDTPA を用いた DTPA 結合ペプチドの合成では分子間架橋結合を形成し、これが低収率の大きな原因となっている (3, 17, 27)。そこで、収率よく DTPA 結合ペプチドを合成するには、ペプチドと結合可能な部位を一つだけ有する DTPA 誘導体を用いることが有効であると考えた。そのため、DTPA の五個のカルボキシル基のうち、一個のカルボキシル基を遊離の状態とし、残りの四つのカルボキシル基を *tert*-butyl (tBu) 基で保護した DTPA 誘導体 (mDTPA) を合成した。得られた mDTPA と固相法で構築した側鎖保護 octreotide 樹脂とを縮合試薬を用いて結合させた後、トリフルオロ酢酸処理で mDTPA の tBu 基と octreotide の側鎖保護基の脱離、および樹脂からの DTPA-D-Phe¹-octreotide 前駆体の遊離を行うことにより、N 末端の D-Phe との結合を介して効率よく DTPA を octreotide に導入することができ、DTPA-D-Phe¹-octreotide の合成収率を cDTPA を用いる方法に比べ 6 倍以上に向上させることに成功した。

次いで、得られた ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide について、マウスに投与後の腎臓における放射能挙動を検討した。経時的に腎臓での放射能を分析したところ、放射性代謝物として最終的に ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体である ^{111}In -DTPA-D-Phe を生成すること、投与 24 時間後においても代謝が完了していないことが明らかとなった。また、これらの代謝物はリソソーム画分に存在したことから、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の腎臓での放射能滞留には、腎臓での代謝が遅いこと、放射性代謝物である ^{111}In -DTPA-D-Phe のリソソーム滞留性が高いこと、またはその両方が関与している可能性が示された。

最近、マクロサイクリックキレート試薬 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-tri-acetic acid (NOTA) をキレート形成部位として導入したタンパク質のガリウム-

67 (^{67}Ga) 標識体において、NOTA をタンパク質中の L-Met と結合させた場合に、 ^{67}Ga -NOTA-L-Met として放射能が腎臓から速やかに消失することが示された (29, 30)。また、D-アミノ酸を含むペプチド結合よりも L-アミノ酸だけからなるペプチド結合の方が生体内で分解されやすい。そこで、腎臓での放射能の低減を目的として、octreotide の N 末端の D-Phe を L-Met あるいは L-Phe に置換した ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体 (^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide) を合成し、生成する放射性代謝物のリソソーム滞留性および腎臓での代謝速度をマウスを用いて ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比較検討した。その結果、腎臓において、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide はそれぞれ ^{111}In -DTPA-L-Met、 ^{111}In -DTPA-L-Phe へと代謝され、その代謝速度は ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比べて速かったが、腎臓に滞留する放射能は ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide とほぼ同等であった。このことから、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体において、腎臓での放射能滞留には腎臓での代謝速度は影響せず、代謝により生成する ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体の高いリソソーム滞留性が関与することが示された。

これまでの結果を基に、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の腎臓での放射能の低減には、その腎尿細管細胞への取り込みを抑制することが有効であると考えた。そこで、腎尿細管からの再吸収にペプチドの正電荷と刷子縁膜の負電荷との相互作用が関与しているとの報告 (31, 32)に着目して、N 末端を酸性アミノ酸にすることにより ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体に負電荷を付与し、腎尿細管細胞への ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の取り込みを低減することを計画した。そのため、N 末端を L-Asp に置換した誘導体 (^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide) を合成し、マウスに投与後の腎臓での放射能挙動を、正電荷を付与するために塩基性アミノ酸である L-Lys に置換した誘導体 (^{111}In -DTPA-L-^αLys¹-octreotide)、中性アミノ酸に置換した ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、および ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比較検討した。その結果、 ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide の腎臓での放射能集積量は、所期の通り、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-

octreotide の約 1/2 以下、 ^{111}In -DTPA-L- $^{\alpha}\text{Lys}^1$ -octreotide の約 1/4 以下となり、N 末端を酸性アミノ酸に置換してペプチドに負電荷を付与することにより、腎臓での放射能集積量を低減することに成功した。

以下、これらの結果について詳述する。

引用文献

- 1) Fischman, A. J., Babich, J. W., and Strauss, H. W. (1993) A ticket to ride: Peptide radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, **34**, 2253-2263.
- 2) Bagutti, C., Stolz, B., Albert, R., Bruns, C., Pless, J., and Eberle, A. N. (1994) [^{111}In]-DTPA-labeled analogues of α -melanocyte-stimulating hormone for melanoma targeting: Receptor binding *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, **58**, 749-755.
- 3) Bakker, W. H., Albert, R., Bruns, C., Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., Marbach, P., Pless, J., Pralet, D., Stolz, B., Koper, J. W., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1991) [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis, radiolabeling and *in vitro* validation. *Life Sci.*, **49**, 1583-1591.
- 4) Bard, D. R. (1995) An improved imaging agent for malignant melanoma, based on [Nle 4 , D-Phe 7]-melanocyte stimulating hormone. *Nucl. Med. Commun.*, **16**, 860-866.
- 5) Bard, D. R., Knight, C. G., and Page-Thomas, D. P. (1990) A chelating derivative of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential imaging agent for malignant melanoma. *Br. J. Cancer*, **62**, 919-922.
- 6) Behr, T. M., Béhé, M., and Becker, W. (1999) Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology. *Q. J. Nucl. Med.*, **43**, 268-280.
- 7) Behr, T. M., Jenner, N., Béhé, M., Angerstein, C., Gratz, S., Raue, F., and Becker, W. (1999) Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J. Nucl. Med.*, **40**, 1029-1044.
- 8) Behr, T. M., Béhé, M., Angerstein, C., Gratz, S., Mach, R., Hagemann, L., Jenner, N., Stiehler, M., Frank-Raue, K., Raue, F., and Becker, W. (1999) Cholecystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: Preclinical development and evaluation of their diagnostic and therapeutic potential. *Clin. Cancer Res.*, **5** (Suppl. 10), 3124-3138.
- 9) Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., van der Pluijm, M., van Koetsveld, P. M., de Jong, M., Setyono-Han, B., Bakker, W. H., Kwekkeboom, D. J., Visser, T. J., Lamberts, S. W. J., and Krenning, E. P. (1994) A new radiolabelled somatostatin analogue [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]RC-160: Preparation, biological activity, receptor scintigraphy in rats and comparison with [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide. *Eur. J. Nucl. Med.*, **21**, 328-335.

- 10) Breeman, W. A. P., van Hagen, M. P., Visser-Wisselaar, H. A., van der Pluijm, M. E., Koper, J. W., Setyono-Han, B., Bakker, W. H., Kwekkeboom, D. J., Hazenberg, M. P., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1996) In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [indium-111-DTPA-Arg¹]substance P. *J. Nucl. Med.*, **37**, 108-117.
- 11) Breeman, W. A. P., van Hagen, P. M., Kwekkeboom, D. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1998) Somatostatin receptor scintigraphy using [¹¹¹In-DTPA⁰]RC-160 in humans: A comparison with [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide. *Eur. J. Nucl. Med.*, **25**, 182-186.
- 12) Breeman, W. A. P., de Jong, M., Bernard, B. F., Hofland, L. J., Srinivasan, A., van der Pluijm, M. E., Bakker, W. H., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1998) Tissue distribution and metabolism of radioiodinated DTPA⁰, D-Tyr¹ and Tyr³ derivatives of octreotide in rats. *Anticancer Res.*, **18**, 83-90.
- 13) Breeman, W. A. P., de Jong, M., Bernard, B. F., Kwekkeboom, D. J., Srinivasan, A., van der Pluijm, M. E., Hofland, L. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1999) Pre-clinical evaluation of [¹¹¹In-DTPA-Pro¹, Tyr⁴]bombesin, a new radioligand for bombesin-receptor scintigraphy. *Int. J. Cancer*, **83**, 657-663.
- 14) Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., de Jong, M., Bernard, B. F., Srinivasan, A., Kwekkeboom, D. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1999) Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy. *Int. J. Cancer*, **81**, 658-665.
- 15) de Jong, M., Breeman, W. A. P., Bakker, W. H., Kooij, P. P. M., Bernard, B. F., Hofland, L. J., Visser, T. J., Srinivasan, A., Schmidt, M. A., Erion, J. L., Bugaj, J. E., Mäcke, H. R., and Krenning, E. P. (1998) Comparison of ¹¹¹In-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Res.*, **58**, 437-441.
- 16) de Jong, M., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Bernard, B. F., Hofland, L. J., Visser, T. J., Srinivasan, A., Schmidt, M., Béhé, M., Mäcke, H. R., and Krenning, E. P. (1998) Pre-clinical comparison of [DTPA⁰] octreotide, [DTPA⁰, Tyr³] octreotide and [DOTA⁰, Tyr³] octreotide as carriers for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer*, **75**, 406-411.
- 17) Fischman, A. J., Pike, M. C., Kroon, D., Fucello, A. J., Rexinger, D., tenKate, C., Wilkinson, R., Rubin, R. H., and Strauss, H. W. (1991) Imaging focal sites of

- bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl. Med.*, **32**, 483-491.
- 18) Krenning, E. P., Bakker, W. H., Kooij, P. P. M., Breeman, W. A. P., Oei, H. Y., de Jong, M., Reubi, J. C., Visser, T. J., Bruns, C., Kwekkeboom, D. J., Reijs, A. E. M., van Hagen, P. M., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1992) Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe¹-octreotide in man: Metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr³-octreotide. *J. Nucl. Med.*, **33**, 652-658.
 - 19) Lastoria, S., Palmieri, G., Muto, P., and Lombardi, G. (1999) Functional imaging of thymic disorders. *Ann. Med.*, **31** (Suppl. 2), 63-69.
 - 20) Mokotoff, M., Swanson, D. P., Jonnalagadda, S. S., Epperly, M. W., and Brown, M. L. (1997) Evaluation of laminin peptide fragments labeled with indium-111 for the potential imaging of malignant tumors. *J. Peptide Res.*, **49**, 510-516.
 - 21) Raderer, M., Kurtaran, A., Leimer, M., Angelberger, P., Niederle, B., Vierhapper, H., Vorbeck, F., Hejna, M. H. L., Scheithauer, W., Pidlich, J., and Virgolini, I. (2000) Value of peptide receptor scintigraphy using ¹²³I-vasoactive intestinal peptide and ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide in 194 carcinoid patients: Vienna university experience, 1993 to 1998. *J. Clin. Oncol.*, **18**, 1331-1336.
 - 22) van Hagen, P. M., Breeman, W. A. P., Reubi, J. C., Postema, P. T. E., van den Anker-Lugtenburg, P. J., Kwekkeboom, D. J., Laissue, J., Waser, B., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1996) Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man. *Eur. J. Nucl. Med.*, **23**, 1508-1513.
 - 23) Krenning, E. P., Kooij, P. P. M., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Postema, P. T. E., Kwekkeboom, D. J., Oei, H. Y., de Jong, M., Visser, T. J., Reijs, A. E. M., and Lamberts, S. W. J. (1994) Radiotherapy with a radiolabeled somatostatin analogue, [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide. A case history. *Ann. NY Acad. Sci.*, **733**, 496-506.
 - 24) Bakker, W. H., Krenning, E. P., Reubi, J.-C., Breeman, W. A. P., Setyono-Han, B., de Jong, M., Kooij, P. P. M., Bruns, C., van Hagen, P. M., Marbach, P., Visser, T. J., Pless, J., and Lamberts, S. W. J. (1991) In vivo application of [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci.*, **49**, 1593-1601.
 - 25) Krenning, E. P., Kwekkeboom, D. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Kooij, P. P. M., Oei, H. Y., van Hagen, P. M., Postema, P. T. E., de Jong, M., Reubi, J. C.,

- Visser, T. J., Reijs, A. E. M., Hofland, L. J., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1993) Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: The Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.*, **20**, 716-731.
- 26) Hnatowich, D. J., Layne, W. W., Childs, R. L., Lanteigne, D., Davis, M. A., Griffin, T. W., and Doherty, P. W. (1983) Radioactive labeling of antibody: A simple and efficient method. *Science*, **220**, 613-615.
- 27) Edwards, W. B., Fields, C. G., Anderson, C. J., Pajean, T. S., Welch, M. J., and Fields, G. B. (1994) Generally applicable, convenient solid-phase synthesis and receptor affinities of octreotide analogs. *J. Med. Chem.*, **37**, 3749-3757.
- 28) Pless, J., Bauer, W., Briner, U., Doepfner, W., Marbach, P., Maurer, R., Petcher, T. J., Reubi, J.-C., and Vonderscher, J. (1986) Chemistry and Pharmacology of SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scand. J. Gastroenterol.*, **21** (Suppl. 119), 54-64.
- 29) Lang, L., Jagoda, E., Wu, C., Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Pastan, I., Paik, C. H., Carrasquillo J. A., and Eckelman, W. C. (1997) Factors influencing the in vivo pharmacokinetics of peptides and antibody fragments: The pharmacokinetics of two PET-labeled low molecular weight proteins. *Q. J. Nucl. Med.*, **41**, 53-61.
- 30) Wu, C., Jagoda, E., Brechbiel, M., Webber, K. O., Pastan, I., Gansow, O., and Eckelman, W. C. (1997) Biodistribution and catabolism of Ga-67-labeled anti-Tac dsFv fragment. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 365-369.
- 31) Bernard, B. F., Krenning, E. P., Breeman, W. A. P., Rolleman, E. J., Bakker, W. H., Visser, T. J., Mäcke, H., and de Jong, M. (1997) D-Lysine reduction of indium-111 octreotide and yttrium-90 octreotide renal uptake. *J. Nucl. Med.*, **38**, 1929-1933.
- 32) de Jong, M., Rolleman, E. J., Bernard, B. F., Visser, T. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., and Krenning, E. P. (1996) Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J. Nucl. Med.*, **37**, 1388-1392.

第 1 章 キレート形成部位 **DTPA** のペプチドへの新規導入法の開発

ペプチドに diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA; Fig. 1-1) を結合させ放射性金属 indium-111 (^{111}In) で標識した ^{111}In -DTPA 結合ペプチド (Fig. 1-2) は、免疫原性が低く、また、組織移行性が速やかなことから、投与早期の診断が可能になるなど、核医学画像診断や内部照射治療に用いる放射性薬剤として優れた性質を有している (1-4)。また、DTPA 結合ペプチドと ^{111}In との錯形成反応が速やか、かつ定量的であることから、未反応の ^{111}In を分離、精製することなく高い比放射能の ^{111}In -DTPA 結合ペプチドを得ることが可能である。

しかし、従来の diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (cDTPA; Fig. 1-1) (5) を用いる DTPA 結合ペプチド (Fig. 1-2) の合成では、収率を低下させる合成過程があることが問題とされている。即ち、cDTPA はペプチドと結合可能な環状酸無水物構造を二つ有するために、ペプチド二分子間で分子間架橋結合を形成し、ペプチドと DTPA が 1:1 で結合した目的とする化合物の収率が低下するというものである (6-8)。また、Tyr 残基の側鎖と cDTPA がエステル結合を形成する副反応 (9) や、結合せずに生成した DTPA が目的物の分離精製を煩雑にした例 (6) も報告されている。したがって、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの臨床核医学診療への幅広い応用のためには、簡便で収率の高い合成法の開発が必須である。

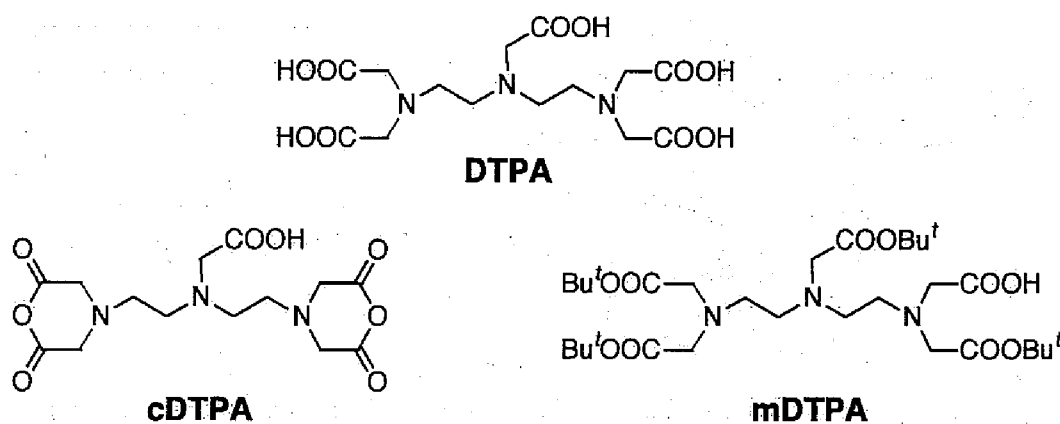


Figure 1-1. Chemical structures of DTPA, cDTPA, and mDTPA.

そこで、本研究では、 ^{111}In 標識体が欧米で既に腫瘍診断薬として臨床への応用が試みられ、また、わが国においても臨床治験が行われ有用性が認められている、DTPA-D-Phe¹-octreotide (Fig. 1-3) (3, 10-12)をモデル化合物として選択し、簡便で高収率な DTPA 結合ペプチドの新規合成法の開発を計画した。

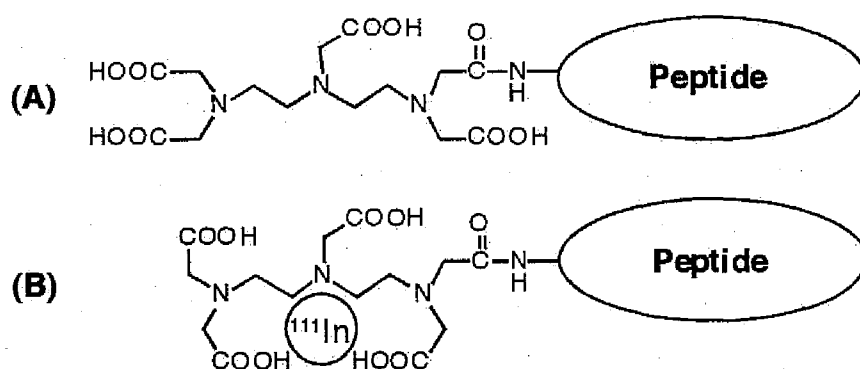


Figure 1-2. Schematic structures of DTPA-conjugated peptide (A) and ^{111}In -DTPA-conjugated peptide (B).

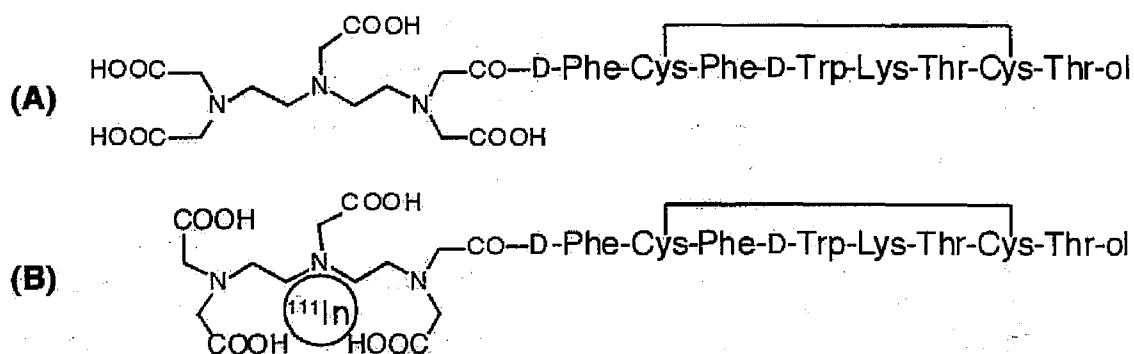


Figure 1-3. Schematic structures of DTPA-D-Phe¹-octreotide (A) and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide (B).

第 1 節 ペプチドとの結合可能な部位を一つだけ有する DTPA 誘導体の開発

DTPA 結合ペプチドの合成収率の向上のためには、分子間架橋結合を形成することなく DTPA 骨格を導入することがもっとも効果的である。そのためには、反応可能な部位を 1 つのみ有し、ペプチド分子へ DTPA 骨格を導入するために種々の有機溶媒に可溶であり、かつ、cDTPA を用いた場合と同じ立体配位構造を形成することのできる DTPA 誘導体を開発することが必要である。そこで、DTPA の五個のカルボキシル基のうち、端の一個のカルボキシル基を遊離の状態とし、他の四個のカルボキシル基を保護した DTPA 誘導体 1-*tert*-butyl hydrogen 3,6,9-tris(*tert*-butoxycarbonyl)methyl-3,6,9-triazaundecanedioic acid (mDTPA; Fig. 1-1)を設計、合成することを検討した。

第 1 項 合成

試薬・機器

^1H -NMR は tetramethylsilane を内部標準物質として Bruker 社製 AC 300 (300 MHz)で測定した。質量分析には日本電子社製 JEOL JMS-HX/HX110 A model を用いた。試薬にはすべて特級試薬を用いた。

di-*tert*-butyl 3-((*tert*-butoxycarbonyl)methyl)-6-(2-((trifluoroacetyl)amino)ethyl)-3,6-diazaoctanedioate (3)

Diethylenetriamine (1.06 g, 10.3 mmol) の乾燥ジクロロメタン溶液 (8 mL)に、0 °C 以下に保ちながら、ethyl trifluoroacetate (1.46 g, 10.3 mmol) の乾燥ジクロロメタン溶液 (12 mL) を滴下した。滴下終了後、0 °C で 2 時間、室温で 1.5 時間攪拌した。溶媒と未反応の ethyl trifluoroacetate を減圧留去し、得られた油状の残渣をアセトニトリル (40 mL)に溶解した。これを 0 °C 以下に冷却し、その温度を保ったまま、*N,N*-diisopropylethylamine (4.65 g, 36 mmol), *tert*-butyl bromoacetate

(7.02 g, 36 mmol) を順次加えた。室温で一晩攪拌した後、減圧留去し、残渣を酢酸エチル (50 mL) に溶解した。この酢酸エチル溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回洗浄し、活性無水硫酸カルシウムで乾燥した後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をジクロロメタン - メタノール (70 : 1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、3.68 g (66 %) の (3) を淡黄色透明の油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.45 (27H, s, ^tBu), 2.75 - 2.79, 2.83 - 2.88 (6H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2$), 3.29 (2H, s, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 3.33 - 3.38 (2H, m, CH_2NHCO), 3.44 (4H, s, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 8.59 (1H, br, amide). FABMS 計算値: $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7$ (MH^+): m/z 542. 測定値: 542.

di-*tert*-butyl 3,6-bis((*tert*-butoxycarbonyl)methyl)-9-(trifluoroacetyl)-3,6,9-triazaundecanedioate (4)

60 % sodium hydride (0.122 g, 3.05 mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド (DMF) 懸濁液 (13 mL) に、 -15°C 以下で、乾燥 DMF (2 mL) に溶解した化合物 (3) (1.38 g, 2.54 mmol) を加えた。添加終了後、反応液を室温に戻し、水素ガスが発生しなくなるまで攪拌した。反応液を 0°C 以下に冷却し、その温度を保ったまま、*tert*-butyl bromoacetate (0.74 g, 3.81 mmol) を滴下した後、再び室温に戻し、一晩攪拌した。反応溶液に酢酸エチル (50 mL) を加え、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回洗浄し、活性無水硫酸カルシウムで乾燥した後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣を酢酸エチル - ヘキサン (1 : 6) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、1.18 g (71 %) の (4) を淡黄色透明の油状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.45 - 1.47 (36H, s, ^tBu), 2.76 - 2.79, 2.85 - 2.92 (6H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2$), 3.31 (2H, s, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 3.42 (4H, s, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 3.55 (2H, m, $\text{CH}_2\text{NCOCF}_3$), 4.16 (1H, s, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 4.29 (1H, d, $\text{NCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$). FABMS 計算値: $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9$ (MH^+): m/z 656. 測定値: 656.

1-benzyl tert-butyl 3,6,9-tris((tert-butoxycarbonyl)methyl)-3,6,9-triazaundecanedioate
(5)

化合物 (4) (2.81 g, 4.28 mmol) を *tert*-butyl alcohol (28 mL) に溶解し、0 °C 以下に保ちながら anhydrous hydrazine (13.5 mL, 428 mmol) を加えた。0 °C 以下に冷却したまま、3.5 時間攪拌した後、反応溶液にジクロロメタン (150 mL) を加えた。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回洗浄し、活性無水硫酸カルシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を乾燥 DMF (22 mL) に溶解し、*N,N*-diisopropylethylamine (0.78 g, 6.03 mmol) を加えた後、0 °C 以下に冷却し、その温度を保ったまま benzyl bromoacetate (1.38 g, 6.03 mmol) を滴下し、滴下終了後、室温に戻して一晩攪拌した。反応溶液に酢酸エチル (150 mL) を加え、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回洗浄し、活性無水硫酸カルシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル - ヘキサン (1:3) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、1.59 g (52 %) の (5) を淡黄色透明の油状物質として得た。

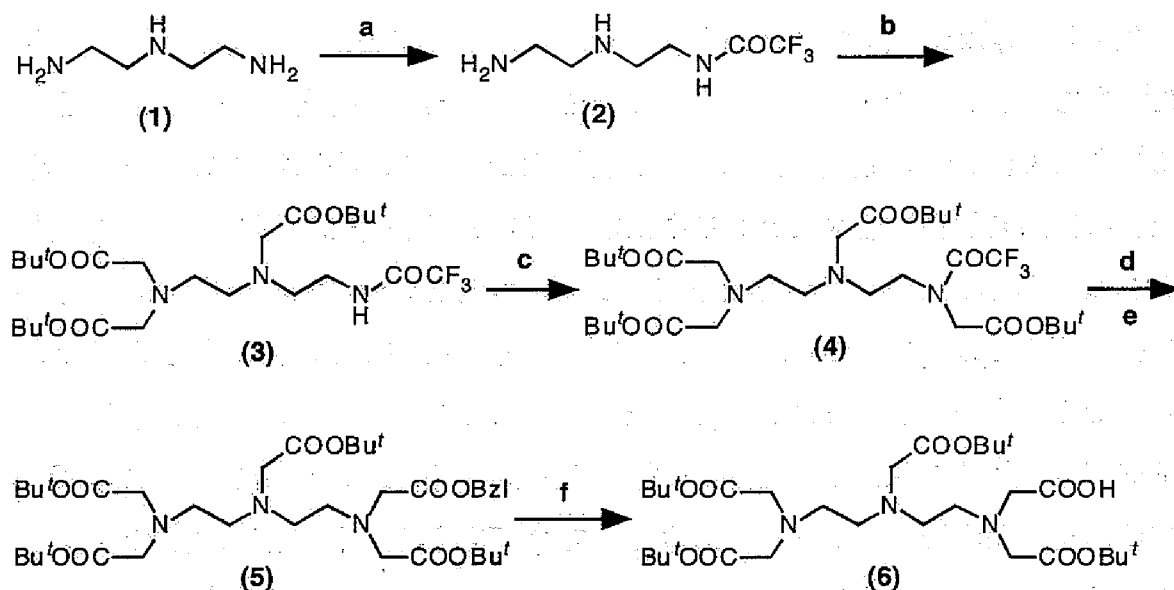
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.44 (36H, s, ^tBu), 2.74 - 2.86 (8H, m, NCH₂CH₂NCH₂CH₂N), 3.33 (2H, s, NCH₂COO^tBu), 3.43 (4H, s, NCH₂COO^tBu), 3.46 (2H, s, NCH₂COO^tBu), 3.64 (2H, s, NCH₂COOBzl), 5.14 (2H, s, CH₂Ph), 7.33 - 7.36 (5H, m, aromatic). FABMS 計算値: C₃₇H₆₂N₃O₁₀ (MH⁺): *m/z* 708. 測定値: 708.

1-tert-butyl hydrogen 3,6,9-tris((tert-butoxycarbonyl)methyl)-3,6,9-triazaundecanedioic acid (6)

パラジウム炭素 (0.1 g) 存在下、化合物 (5) (1.57 g, 2.22 mmol) の酢酸エチル溶液 (18 mL) を水素置換した後、室温で 6 時間攪拌した。触媒を濾去した後、濾液の溶媒を減圧留去し、1.36 g (98 %) の (6) を淡黄色透明の油状物質として得た。

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.45 - 1.47 (36H, s, ^tBu), 2.85 - 2.86 (8H, m, NCH₂CH₂NCH₂CH₂N), 3.44 (4H, s, NCH₂COO^tBu), 3.47 (2H, s, NCH₂COO^tBu), 3.48 (2H, s, NCH₂COO^tBu), 3.49 (2H, s, NCH₂COOH), 5.16 (1H, br, COOH). FABMS 計算値: C₃₀H₅₆N₃O₁₀ (MH⁺): *m/z* 618. 測定値: 618.

Scheme 1-1



第 2 項 結果と考察

cDTPA を用いた場合と同じ立体配位構造を形成し、かつ、反応部位を一つのみ有する mDTPA の合成経路を、Scheme 1-1 に示す。

目的とする化合物が非対称な構造を持つことから、まず、対称な構造を持つ出発原料 (1) の二つある末端のアミンの一方を保護した。このとき、 Bu^t 基が脱離されない条件下で脱離可能なトリフルオロアセチル基による保護を行った。その後、未反応の第一級アミンと第二級アミンを *tert*-butyl bromoacetate でアルキル化し、(3) を合成した。次に、sodium hydride 存在下、アミド窒素を *tert*-butyl bromoacetate でアルキル化し、(4) を得た。(4) のトリフルオロアセチル基の脱離には、最初、炭酸水素ナトリウム水溶液の使用を試みたが、開裂反応が進まなかったため、水酸化ナトリウムを用いたアルカリ条件下での脱離を試みた。

しかし、この場合には、*tert*-butyl 基の solvolysis 反応を伴った。そこで、種々の試薬を試したところ、溶媒に乾燥 *tert*-butyl alcohol を用い、アルカリとして anhydrous hydrazine を使用することにより、選択的な脱保護反応が可能となった。その後、トリフルオロアセチル基の脱保護により生成する第二級アミンを、benzyl bromoacetate を用いてアルキル化し、(5) を合成した。最後に、水素ガスを使用した接触還元により、(5) の benzyl 基を脱離し、目的物の mDTPA (6) を総収率 23.9 % で得た。

mDTPA は、端のカルボキシル基が一つのみ遊離し、他のカルボン酸が温和な酸性条件下で脱離できる *tert*-butyl 基で保護された DTPA 誘導体であり、また、アセトニトリルや DMF の様な有機溶媒に溶解する。したがって、本化合物は、液相、および、固相合成により、DTPA 骨格をペプチドに結合させる上で非常に有用である。

第 2 節 新規 DTPA 誘導体を用いた DTPA 結合ペプチドの合成法の開発

DTPA-D-Phe¹-octreotide の合成の効率を上げることを目的とし、各合成過程を簡便な合成操作で、選択的に進行する反応を用いて行えるように、9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)型固相ペプチド合成により構築した側鎖保護ペプチド樹脂に、直接、mDTPA を縮合させる方法を用いることを考案した。

第 1 項 合成

試薬・機器

DTPA-D-Phe¹-octreotide のアミノ酸分析は、6 N 塩酸を用いて 110 °C、減圧封管中で 18 - 24 時間放置することで、DTPA-D-Phe¹-octreotide を加水分解し、Moore らの方法に従い、加水分解物のアミノ酸組成比を日立アミノ酸分析計 L-8500 で測定することにより行った。¹H-NMR は tetramethylsilane を内部標準物質として Bruker 社製 AC 300 (300 MHz)で測定した。旋光度の測定には、堀場製作所 SEPA-300 を用いた。質量分析の測定には、日本電子社製 JEOL JMS-HX110 (JMA-5000 データシステム)を用いた。融点は、柳本微量融点測定器を用いて測定した。DTPA 結合ペプチドの分析用逆相 HPLC には、YMC 社 YMC AM302 (4.6 × 150 mm)を用い、移動相には 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA)/ H₂O とアセトニトリルを用い、流速 0.9 mL/ min で、アセトニトリルを 30 分間で 20 - 80 %まで直線勾配で変化させた。DTPA 結合ペプチドの分取用逆相 HPLC には、YMC 社 YMC SH-343-5AM (20 × 250 mm)を用い、移動相には 0.1 % TFA/ H₂O とアセトニトリルを用い、流速 5 mL/ min で、アセトニトリルを 60 分間で 20 - 80 %まで直線勾配で変化させた。Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)には、Pharmacia 社製 Pharmacia FPLC system を使用し、分取用カラムとして YMC ODS-AQ300 (20 × 500 mm) を使用した。溶出液には、0.1 % TFA 水溶液と 60 % アセトニトリル/ 0.1 % TFA 水溶液を用い、流速 3 mL/ min で、60 % アセトニトリル/ 0.1 % TFA

水溶液を 400 分間で 0 - 100 %まで直線勾配で変化させた。 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の逆相 HPLC による分析には、ナカライテスク社 Cosmosil 5C₁₈-MS (4.6 × 150 mm)を使用し、移動相には 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5)とメタノールを用い、流速 1.0 mL/min で、メタノールを 20 分間で 40 - 80 %まで直線勾配で変化させた後、その組成比を 5 分間保った (6)。 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の放射化学的純度は TLC とセルロースアセテート膜電気泳動 (CAE)によっても求めた。TLC は、Merck 社 5553 を用い、10 % 塩化アンモニウムとメタノールの混合溶媒 (1 : 1) 中で展開した。CAE は、Joko 社 Separax を用い、veronal 緩衝液 (イオン強度 0.06, pH 8.6) 中、40 分間、0.8 mA/cm で行った。Fmoc-アミノ酸と 2-chlorotriyl chloride resin は Nova Biochem 社から購入した。 $^{111}\text{InCl}_3$ は日本メジフィジックス社より供給を受けた。その他の試薬にはすべて特級試薬を用いた。

Fmoc-Thr(^tBu)-ol の合成

Rodriguez らの方法に従い合成した (13)。Fmoc-Thr(^tBu)-OH (1.99 g, 5 mmol)を 5 mL の ethylene glycol dimethyl ether に溶解し、- 15 °C 以下に冷却した後、N-methylmorpholin (0.56 mL, 5 mmol)、isobutyl chloroformate (0.65 mL, 5 mmol)を加えた。1 分後に沈殿を除き、直ちに、- 15 °C 以下で 5 mL の蒸留水に懸濁させた NaBH₄ (0.57 g, 15 mmol)を加え、さらに 30 秒後に 125 mL の蒸留水を加えた。反応溶液を酢酸エチルで 3 回抽出し、有機層を 5 %炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で 3 回ずつ洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をクロロホルムを展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、1.36 g (70.9 %)の目的物を白色の粉末として得た。

mp: 42- 45 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.16 (3H, d, CHCH₃), 1.20 (9H, s, ^tBu), 2.88 (1H, br, OH), 3.61 (1H, br, CHCH₂OH), 3.66 (2H, br, CHCH₂OH), 3.94 (1H, m, CHCH₃), 4.22 (1H, t, CHCH₂CO), 4.40 (2H, m, CHCH₂CO), 5.28 (1H, d, NH), 7.30 (2H, d, aromatics), 7.38 (2H, t, aromatics), 7.59 (2H, d, aromatics), 7.74 (2H, d, aromatics). FABMS 計算値: C₂₃H₂₉NO₄(MH⁺): *m/z* 384.2175. 測定値: 384.2159. $[\alpha]_D^{26} = +0.017$

(5.08 mg/ mL, CH₃OH).

2-chlorotrityl chloride resin への Fmoc-Thr(^tBu)-ol の導入

Wenschuh らの方法 (14)に従い、Fmoc-Thr(^tBu)-ol を 2-chlorotrityl chloride resin へ導入した。Fmoc-Thr(^tBu)-ol (679 mg, 1.77 mmol)をジクロロメタン (2.89 mL)と DMF (2.89 mL)の混液に溶解し、この溶液と pyridine (0.286 mL, 3.54 mmol)を順次、2-chlorotrityl chloride resin (393 mg, 1.5 mmol/ g)の入った反応容器に加え、室温で 21 時間攪拌し、Fmoc-Thr(^tBu)-ol を樹脂に導入した。DMF で洗浄した後、5 mL のメタノールを加え室温で 1.5 時間攪拌し樹脂を不活性化し、DMF、次いでジクロロメタンで洗浄した。樹脂を乾燥させた後、Meienhofer らの方法 (15)に従い、piperidine 処理の際に生成する *N*-(9-fluorenylmethyl)piperidine の 301 nm における吸光度を測定することにより Fmoc-Thr(^tBu)-ol の樹脂への導入量を定量したところ、0.287 mmol/ g であった。

保護ペプチド鎖の延長

以下に示す N^α-Fmoc 基の脱保護と側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体の縮合反応を繰り返すことにより、保護ペプチド鎖を延長した (16)。

N^α-Fmoc 基の脱保護：

20 % piperidine/ DMF (3 mL)を加え、20 分間室温で攪拌した。反応終了後、洗浄液が中性になるまで DMF で樹脂を洗浄した。

側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体の縮合反応：

N^α-Fmoc 基を脱離した保護ペプチド樹脂に側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体 (2.5 当量)と 1-hydroxybenzotriazole hydrate (2.5 当量)を加え、DMF (1.5 mL)に溶解し、1,3-diisopropylcarbodiimide (2.5 当量)をさらに加え、室温で 1.5 時間攪拌した。DMF で洗浄した後、樹脂を一部採取して Kaiser test (17)を行い、陰性を示すまで縮合反応を繰り返した。なお、保護ペプチド樹脂に側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体には、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Thr(^tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-D-Trip-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-D-Phe-OH を用いた (Boc: *tert*-

butyloxycarbonyl, Ac_m: acetamidomethyl)。

mDTPA の縮合

樹脂上で保護ペプチド鎖を構築した後、上述の方法と同様に、20 % piperidine/DMF 処理によって N^α-Fmoc 基を脱離し、その後、DMF 中で 1-hydroxybenzotriazole hydrate (2.5 当量)と 1,3-diisopropylcarbodiimide (2.5 当量)の存在下、mDTPA (2.5 当量)と 1.5 時間攪拌した。

DTPA 結合ペプチド鎖の樹脂からの遊離と酸感受性側鎖保護基の脱離

mDTPA の結合した保護ペプチド樹脂 (200 mg)に、0 °C で thioanisole (0.5 mL)、TFA (5 mL)を順次加えた後、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を再び 0 °C にし、ジエチルエーテルを加え、粗生成物を析出させた後、6 M 塩酸グアニジン溶液でペプチドを抽出した。ジエチルエーテルで 2 回洗浄した後、樹脂をガラスフィルターで取り除いた。孔径 0.45 μm の水系フィルターで濾過し、FPLC に付した。目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、白色羽毛状の DTPA-D-Phe-Cys(Ac_m)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Ac_m)-Thr-ol を 51.89 mg 得た。Fmoc-Thr(^tBu)-ol の樹脂への導入以降の収率は 58.8 %であった。逆相 HPLC による分析を行ったところ、精製したペプチドは Fig. 1-4 に示すように 11.95 分に単一のピークを示した。

アミノ酸組成比: Thr × 1, 0.90; Phe × 2, 2.00; Lys × 1, 1.07. FAB-MS 計算値: C₆₉H₁₀₀N₁₅O₂₁S₂ (MH⁺), *m/z* 1538.6660. 測定値: 1538.6713.

ジスルフィド結合の形成

S 保護ペプチド (10 mg, 6.5 μmol)を 80 % メタノール水溶液 (10 mL)に溶解した後、20 % ヨウ素のメタノール溶液 (217 μL, 171.9 μmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。1 M アスコルビン酸水溶液を加えて反応を停止させた後、FPLC、および、逆相 HPLC により分取した。目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、白色羽毛状の DTPA-D-Phe¹-octreotide 4.91 mg (54.1 %)を得た。逆相 HPLC によ

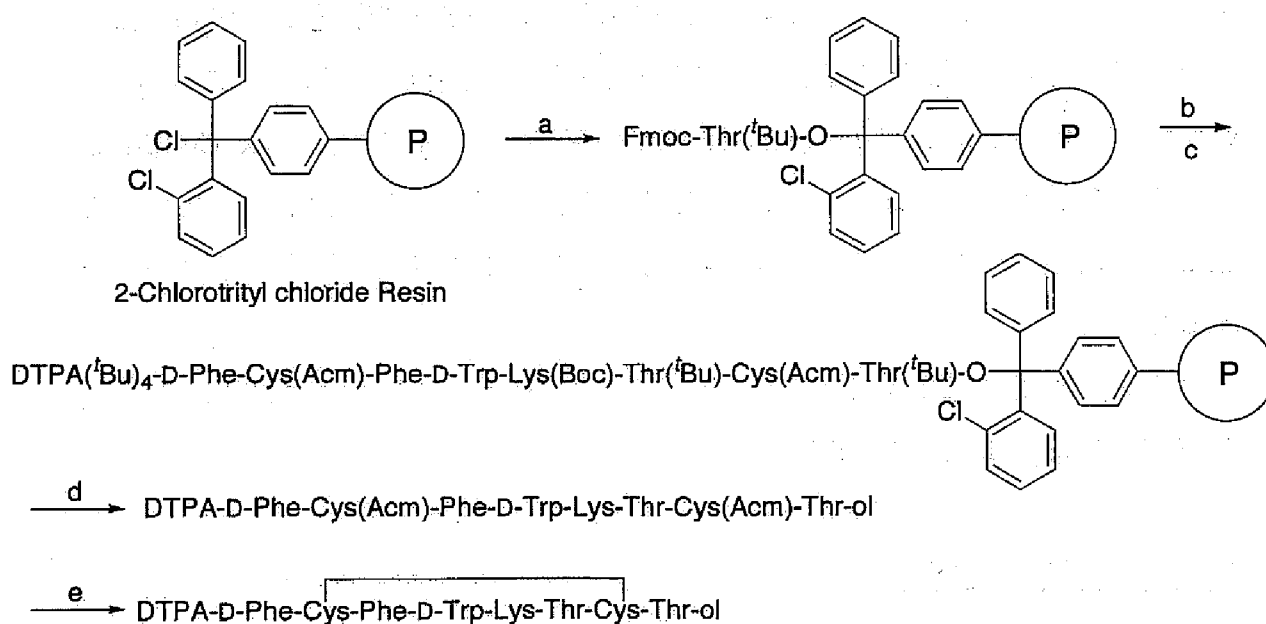
る分析を行ったところ、Fig. 1-5 に示すように 12.50 分に単一のピークを示した。

アミノ酸組成比: Thr × 1, 0.87; Phe × 2, 2.00; Lys × 1, 1.15. FABMS 計算値: $C_{63}H_{88}N_{13}O_{19}S_2$ (MH^+), m/z 1394.5761. 測定値: 1394.5789.

DTPA-D-Phe¹-octreotide の ^{111}In 標識

DTPA-D-Phe¹-octreotide の ^{111}In 標識は、Bakker らの方法 (6) に準じて行った。DTPA-D-Phe¹-octreotide (1 μg) を 0.1 M 酢酸 (20 μL) に溶解させた後、 $^{111}InCl_3$ の 0.02 N 塩酸溶液 (74 MBq/ mL, 58 μL) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。分析は、逆相 HPLC、TLC、および CAE により行った。

Scheme 1-2



Reagents: (a) Fmoc-Thr(^tBu)-ol, pyridine; (b) Stepwise Elongation; (c) mDTPA, 1,3-diisopropylcarbodiimide, 1-hydroxybenzotriazole; (d) CF_3COOH , thioanisole; (e) I_2 .

第 2 項 結果と考察

DTPA-D-Phe¹-octreotide は、当初、まず octreotide を合成し、その Lys 残基の N^ε-アミノ基を Boc 基で保護した後、cDTPA を用いて N^ε-アミノ基に DTPA 骨格を導入することによって合成されていた (6)。しかし、目的物の合成収率は、その合成過程に選択性のない二つの反応があるために非常に低いものであった。選択性のない反応の一つは、octreotide と (Boc)₂O との反応である。この反応では、N 末端の N^ε-アミノ基、リジン残基の N^ε-アミノ基、および、両アミノ基が Boc 基で保護された誘導体と、さらに未反応の原料との混合物が得られるため、cDTPA との反応の前に目的とする N^ε-アミノ基を保護した誘導体を分離精製する必要がある。選択性のないもう一つの反応は、cDTPA と N^ε-アミノ基保護 octreotide との反応である。本反応では、cDTPA が環状酸無水物構造を二つ有するため、分子間架橋反応をさけることができない。同様の現象が cDTPA と chmotactic peptide との反応においても観察されている (7)。また、cDTPA との反応後、ペプチド分子と反応せずに生成した DTPA を分離除去するために数種類の方法により精製する必要があることから、操作が煩雑であり、収率の低下を招いた (6)。

一方、最近、Edwards らが固相ペプチド合成により DTPA-D-Phe¹-octreotide を合成した (8)。即ち、固相法により側鎖保護ペプチド樹脂を構築し、そのまま樹脂上でジスルフィド結合の形成と cDTPA を用いた DTPA 骨格の導入反応を行った後、threoninol との aminolysis 反応によりペプチド鎖を樹脂から遊離し、最後に TFA 処理により側鎖保護基を脱離することにより、目的物を得た。この方法では、最初に開発された合成方法にみられた二つの選択性のない反応のうちの一つ、つまり、(Boc)₂O による N^ε-アミノ基の保護過程を省くことができたにも関わらず、その全合成収率は 5 % にすぎなかった。この低い合成収率の原因は cDTPA を用いた DTPA 骨格の導入反応において、分子間架橋結合が生じるためであると考えられる。

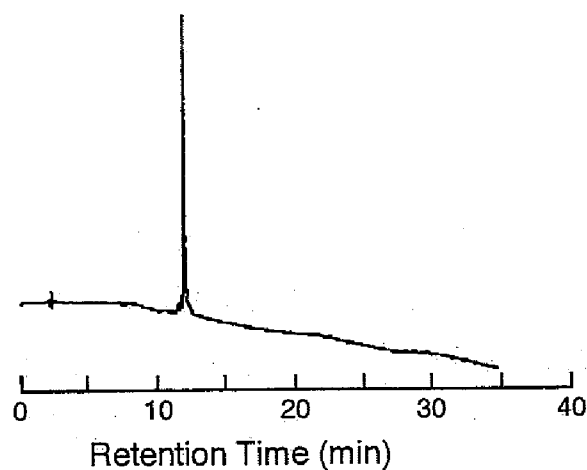


Figure 1-4. Analytical HPLC chromatogram of DTPA-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-ol.

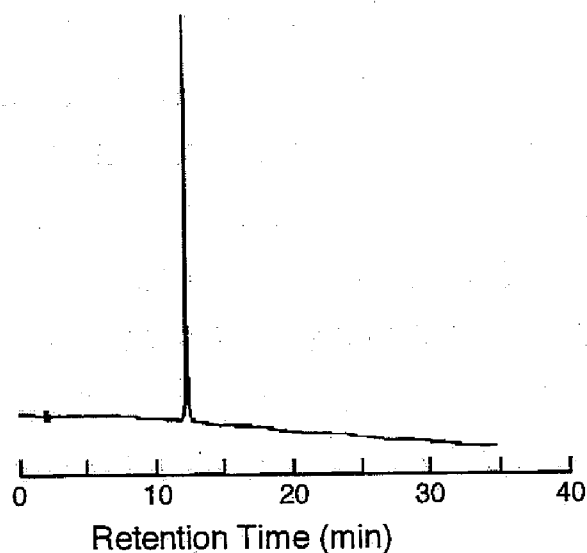


Figure 1-5. Analytical HPLC chromatogram of DTPA-D-Phe¹-octreotide.

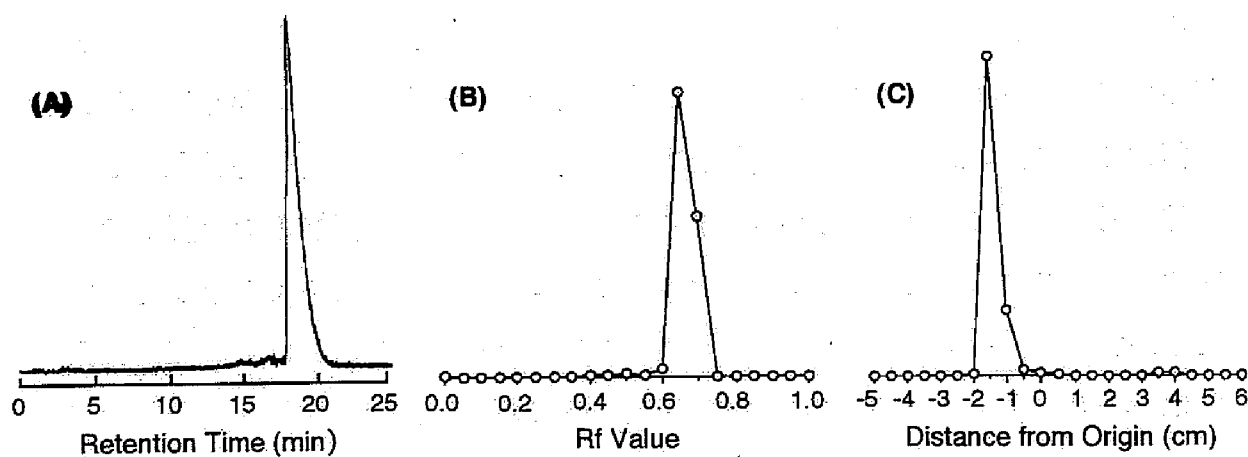


Figure 1-6. Radioactivity chromatograms of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide on analytical HPLC (A), TLC (B) and CAE (C).

これらのことから、分子間架橋結合を形成することなく DTPA 骨格を導入することができれば、DTPA-D-Phe¹-octreotide を高い収率で合成できることが予測される。そこで、本研究では、先に示した反応可能な部位を一つのみ有する mDTPA を用いた新規合成法を考案した (Scheme 1-2)。まず、Rodriguez らの方法 (13)に従って Fmoc-Thr(^tBu)-ol を合成し、これを Wenschuh らの方法 (14)に従って 2-chlorotritylchloride resin に導入したところ、置換率は 0.29 mmol/g であった。その後、piperidine 処理による Fmoc 基の脱離と 1-hydroxybenzotriazole hydrate、1,3-diisopropylcarbodiimide を用いた N^α-Fmoc-アミノ酸の縮合反応を繰り返して保護ペプチド鎖を延長し、D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(^tBu)-Cys(Acm)-Thr(^tBu)-ol-resin を構築した。縮合剤として 1-hydroxybenzotriazole hydrate、1,3-diisopropylcarbodiimide を用い、mDTPA をペプチド鎖の N^α-アミノ基に結合した後、TFA-thioanisole 処理により保護 DTPA 結合ペプチド鎖の樹脂からの遊離と ^tBu 基、Boc 基の脱離を行い、次いで FPLC を用いて精製することにより、DTPA-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-ol を得た。純度、構造は逆相 HPLC (Fig. 1-4)、質量分析、アミノ酸分析により確認し、Fmoc-Thr(^tBu)-ol-resin から計算した収率は 58.8 %であった。次に、ヨウ素酸化によりジスルフィド結合を形成し、反応をアスコルビン酸の添加によって停止した後、FPLC、次いで逆相 HPLC による精製を行い、54.1 %の収率で目的物である DTPA-D-Phe¹-octreotide を得た。逆相 HPLC による分析において単一のピークを示すことを確認し (Fig. 1-5)、質量分析値、アミノ酸分析値が理論値と一致することを確認した。また、¹¹¹In 標識をしたところ、得られた ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide は逆相 HPLC、TLC、CAE のいずれの分析においても 95 %以上の放射化学的純度を示し (Fig. 1-6)、その比放射能は 4.3 MBq/ μg であった。このことから、DTPA がキレート部位として機能していることが確認された。

環化反応における収率は 54.1 %と低かったが、これは、Trp 残基が関与した副反応が起こったためと考えられる (8)。この環化反応の収率が低いにも関わらず、Fmoc-Thr(^tBu)-ol-resin から計算した DTPA-D-Phe¹-octreotide の収率は 31.8 %

であり、以前に報告された合成方法と比べ、非常に高いものであった。これは、mDTPA を用いて DTPA 骨格を導入することにより、すべて選択的な反応で合成することができたためと考えられる。以上、従来の cDTPA を用いた方法と比べ、簡便で高収率な DTPA 結合ペプチドの合成法の開発に成功した。

本章では、DTPA-D-Phe¹-octreotide をモデル化合物として、従来の cDTPA を用いる方法では困難であった簡便で高収率な DTPA 結合ペプチドの合成法を開発することを目的とした。まず、反応部位を一つのみ有する DTPA 誘導体、mDTPA を開発し、次いで、mDTPA を固相ペプチド合成に適用した DTPA 結合ペプチドの合成法を開発した。本法による DTPA-D-Phe¹-octreotide の合成収率は、cDTPA を用いた従来の方法と比べ大幅に向上し、また、精製操作をも簡略化することができた。以上の結果は、本法が優れた DTPA 結合ペプチドの合成法であることを示す。最近、低分子量ペプチドを母体化合物とする放射性薬剤の開発が精力的に進められている (18)。DTPA は、核医学画像診断、内部照射治療において優れた性質を持つ ¹¹¹In と速やかに安定なキレートを形成し、また、¹¹¹In-DTPA キレートは、結合したペプチドの尿排泄性を高めて上腹部への放射能集積を軽減し、そこでの診断精度を上げ、不要な放射線被曝を低減することから、本章で示した DTPA 結合ペプチドの合成法は、核医学画像診断、内部照射治療を目的とする放射性薬剤の開発に大きく貢献するものと考えられる。

引用文献

- 1) Krenning, E. P., Bakker, W. H., Kooij, P. P. M., Breeman, W. A. P., Oei, H. Y., de Jong, M., Reubi, J. C., Visser, T. J., Bruns, C., Kwekkeboom, D. J., Reijs, A. E. M., van Hagen, P. M., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1992) Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: Metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide. *J. Nucl. Med.*, **33**, 652-658.
- 2) Bakker, W. H., Krenning, E. P., Reubi, J.-C., Breeman, W. A. P., Setyono-Han, B., de Jong, M., Kooij, P. P. M., Bruns, C., van Hagen, P. M., Marbach, P., Visser, T. J., Pless, J., and Lamberts, S. W. J. (1991) In vivo application of [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci.*, **49**, 1593-1601.
- 3) Krenning, E. P., Kwekkeboom, D. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Kooij, P. P. M., Oei, H. Y., van Hagen, P. M., Postema, P. T. E., de Jong, M., Reubi, J. C., Visser, T. J., Reijs, A. E. M., Hofland, L. J., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1993) Somatostatin receptor scintigraphy with [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]- and [^{123}I -Tyr 3]-octreotide: The Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.*, **20**, 716-731.
- 4) 細野 眞 (1998) モノクローナル抗体やペプチドを用いた腫瘍核医学. 核医学, **35**, 681-687.
- 5) Hnatowich, D. J., Layne, W. W., Childs, R. L., Lantaigne, D., Davis, M. A., Griffin, T. W., and Doherty, P. W. (1983) Radioactive labeling of antibody: A simple and efficient method. *Science*, **220**, 613-615.
- 6) Bakker, W. H., Albert, R., Bruns, C., Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., Marbach, P., Pless, J., Pralet, D., Stolz, B., Koper, J. W., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1991) [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci.*, **49**, 1583-1591.
- 7) Fischman, A. J., Pike, M. C., Kroon, D., Fucello, A. J., Rexinger, D., tenKate, C., Wilkinson, R., Rubin, R. H., and Strauss, H. W. (1991) Imaging focal sites of bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl. Med.*, **32**, 483-491.

- 8) Edwards, W. B., Fields, C. G., Anderson, C. J., Pajean, T. S., Welch, M. J., and Fields, G. B. (1994) Generally applicable, convenient solid-phase synthesis and receptor affinities of octreotide analogs. *J. Med. Chem.*, **37**, 3749-3757.
- 9) Maisano, F., Gozzini, L., and de Haën, C. (1992) Coupling of DTPA to proteins: A critical analysis of the cyclic dianhydride method in the case of insulin modification. *Bioconjugate Chem.*, **3**, 212-217.
- 10) Raderer, M., Kurtaran, A., Leimer, M., Angelberger, P., Niederle, B., Vierhapper, H., Vorbeck, F., Hejna, M. H. L., Scheithauer, W., Pidlich, J., and Virgolini, I. (2000) Value of peptide receptor scintigraphy using ^{123}I -vasoactive intestinal peptide and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide in 194 carcinoid patients: Vienna university experience, 1993 to 1998. *J. Clin. Oncol.*, **18**, 1331-1336.
- 11) 井上 登美夫, 大竹 英則, 平野 恒夫, 富吉 勝美, 遠藤 啓吾, 田中 孝司, 清水 直容, 斎藤 達雄 (1995) ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotideの安全性、薬物動態、被曝線量の検討 —第1相臨床試験報告—. *核医学*, **32**, 511-521.
- 12) 山本 和高, 石井 靖, 古舘 正從, 伊藤 和夫, 塚本 江利子, 金丸 龍之介, 遠藤 啓吾, 平野 恒夫, 田中 孝司, 荻野 良郎, 宇野 公一, 久保 敦司, 橋本 順, 日下部 きよ子, 牧 正子, 佐々木 康人, 瀬戸 光, 利波 紀久, 石垣 武男, 中川 毅, 松下 智人, 小西 淳二, 阪原 晴海, 長谷川 義尚, 池窪 勝治, 渡邊 祐司, 濱本 研, 増田 康治, 中條 政敬, 中別府 良昭, 鳥塚 莞爾 (1995) ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotideの消化管ホルモン産生腫瘍を対象とした第Ⅲ相臨床試験. *核医学*, **32**, 1269-1280.
- 13) Rodriguez, M., Llinares, M., Doulut, S., Heitz, A., and Martinez, J. (1991) A facile synthesis of chiral N-protected β -amino alcohols. *Tetrahedron Letters*, **32**, 923-926.
- 14) Wenschuh, H., Beyermann, M., Haber, H., Seydel, J. K., Krause, E., and Bienert, M. (1995) Stepwise automated solid phase synthesis of naturally occurring peptaibols using Fmoc amino acid fluorides. *J. Org. Chem.*, **60**, 405-410.
- 15) Meienhofer, J., Waki, M., Heimer, E. P., Lambros, T. J., Makofske, R. C., and Chang, C.-D. (1979) Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **13**, 35-42.
- 16) Akaji, K., Fujii, N., Tokunaga, F., Miyata, T., Iwanaga, S., and Yajima, H. (1989) CLXVIII. Syntheses of three peptides isolated from horseshoe crab hemocytes, Tachyplesin I, Tachyplesin II, and Polyphemusin I. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2661-

2664.

- 17) Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., and Cook, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Chem.* **34**, 595-598.
- 18) Fischman, A. J., Babich, J. W., and Strauss, H. W. (1993) A ticket to ride: Peptide radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, **34**, 2253-2263.

第 2 章 $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ およびその誘導体の腎臓における放射能挙動に関する検討

$^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドは、標的組織への速やかな移行性と均一な分布、および、血液中からの速やかな消失を示すことより投与後早期の診断を可能にすること、また、水溶性が高く尿排泄性により上腹部の放射能集積量を低減することから上腹部での診断精度を向上させることなど、核医学画像診断や内部照射治療に用いる放射性薬剤として優れた性質を有している (1-3)。しかし、その一方で、体内に投与した後、標的組織だけでなく、正常な腎臓においても高い放射能が非特異的に集積し、長時間にわたる放射能滞留を示すため、診断精度の低下を招く (1-3)。このことはまた、高放射能の $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドを用いた腫瘍治療 (4) の場合にも、放射線被曝の観点から問題となる。したがって、腎臓での高い放射能集積、滞留を解消することが、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドの臨床応用のためには重要である。そこで、前章で開発した $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドの合成法を用いて、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ (Fig. 2-1)、および、その N 末端を置換した誘導体を合成し、それらの腎臓における放射能挙動について検討した。



Figure 2-1. Structure of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$.

第 1 節 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 投与後の腎臓における放射能挙動の検討

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ (Fig. 2-1)は、核医学画像診断、内部照射治療を目的とした放射性薬剤として最も有望な $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドの一つである (3, 4)。本薬剤は、ソマトスタチン誘導体 octreotide の N 末端アミノ酸残基 D-Phe の α -アミノ基に $^{111}\text{In-DTPA}$ を結合した構造を有し、欧米では消化管ホルモン産生腫瘍、下垂体腫瘍、褐色細胞腫、甲状腺髄様癌、カルチノイド、小細胞肺癌などのソマトスタチン受容体発現腫瘍の画像診断薬剤として既に臨床での検討が行われている (3, 4)。また、わが国においても臨床治験が行われ、その有用性が確認されている (5, 6)。本薬剤を体内に投与した後、はじめの 4.5 時間で投与した放射能の約 50 % が主に腎臓を経由して体外に排泄され、放射性ヨウ素標識体の場合に観察される上腹部での放射能集積を低減した。しかし、投与した放射能の約 7 % が投与 4 時間後までに腎細胞に取り込まれ、48 時間後においても約 5 % が残存し、腎臓近傍に存在する小さな腫瘍の検出感度を低下させた (1)。したがって、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ の場合も他の $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドと同様、診断精度の向上のためには腎臓での放射能集積量の低減が不可欠と考えられる。そこで、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドを投与した後に観察される腎臓での高い放射能集積量を低減させる方法を開発するために、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ をモデル化合物として、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドの腎臓での放射能滞留の原因について検討した。

最近、Bernard らが、L-Lysine のような塩基性アミノ酸の投与により、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 投与後の腎臓での放射能集積が低減することを報告した (7, 8)。また、Duncan らは、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ をラットに投与したとき、初期から放射能が脾臓、腫瘍、腎臓の細胞のリソソーム画分に存在することを見いだしている (9)。これらの結果は、多くのポリペプチドが腎臓で代謝を受けるのと同じように (10-13)、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ が主に糸球体濾過を受けた後に尿細管から再吸収を受けて腎細胞に取り込まれ、その後、リソ

ソームに輸送されることを示唆している。しかし、放射能滞留の機序を解明するには、腎細胞内に内在化した後の ^{111}In 結合体の挙動をより詳細に理解することが必要である。そこで、本節においては、前章で合成した ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide をマウスに投与後の腎臓、および、尿中の放射能を分析した。

第 1 項 実験方法

試薬・機器

$^{111}\text{InCl}_3$ は日本メジフィジックス社より供給を受けた。非放射性 InCl_3 はナカライテスク社より $\text{InCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として購入した。1-*tert*-butyl hydrogen 3,6,9-tris((*tert*-butoxycarbonyl)methyl)-3,6,9-triazaundecanedioic acid (mDTPA) は前章の方法に従い合成した。逆相 HPLC には、ナカライテスク社 Cosmosil 5C₁₈-MS (4.6 × 150 mm) を使用し、移動相には 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) とメタノールを用いた。流速 1.0 mL/min で、最初の 15 分間は 5 % メタノール、続く 10 分間でメタノールを 5 から 55 % へと直線勾配で増加させ、最後の 25 分間を 55 % メタノールで溶出した。CAE は、第 1 章第 2 節に述べた条件で行った。¹H-NMR は tetramethylsilane を内部標準物質として Bruker 社製 AC 200 (200 MHz) で測定した。高速原子衝撃質量分析法 (FABMS) には日本電子社製 JEOL JMS-HX/HX110 A を用いた。試薬にはすべて特級試薬を用いた。

DTPA-D-Phe

mDTPA (536 mg, 0.868 mmol) と *N*-hydroxysuccinimide (110 mg, 0.954 mmol) を 0.5 mL の DMF に溶解し、氷冷下、dicyclohexylcarbodiimide (196 mg, 0.954 mmol) の DMF 溶液 (0.5 mL) を滴下し、滴下終了後、室温で 4 時間攪拌した。一方、D-phenylalanine benzylester *p*-toluensulfonate (371 mg, 0.868 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解し、氷冷下、diisopropylethylamine (112 mg, 0.868 mmol) で中和した後、氷冷下で mDTPA 溶液に滴下し、滴下終了後、室温で 18 時間攪拌した。反応溶液を濾過し、濾液を酢酸エチル (200 mL) で抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナ

トリウム水溶液 (150 mL) で 3 回洗浄し、活性無水硫酸カルシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム : メタノール (25 : 1) を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、411 mg (55.5 %) の DTPA(^tBu)₄-D-Phe-OBzl を淡黄色油状物質として得た。

DTPA(^tBu)₄-D-Phe-OBzl (411 mg, 0.481 mmol) を酢酸エチル (4 mL) に溶解し、0.14 g のパラジウム炭素存在下、接触還元を行った。60 時間後、パラジウム炭素を濾去、溶媒を減圧留去し、167 mg (45.3 %) の DTPA(^tBu)₄-D-Phe を淡黄色油状物質として得た。

DTPA(^tBu)₄-D-Phe (90 mg, 0.118 mmol) に anisole (51 μ L, 0.471 mmol)、次いで 0 °C 以下で TFA (1.5 mL) を加え、5 分後に室温に戻し、7 時間攪拌した。減圧留去により TFA を除去した後、5 mL の乾燥ジエチルエーテルを加え、43.0 mg (90.4 %) の DTPA-D-Phe を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.84 - 3.20 (10H, m, CH₂CH₂, CH₂C₆H₅), 3.30 (2H, s, NCH₂CO), 3.31 (2H, s, NCH₂CO), 3.49 (4H, s, NCH₂CO), 3.96 (2H, s, NCH₂CO), 4.42 - 4.51 (1H, m, NHCH), 7.16 - 7.31 (5H, m, aromatic), 8.28 (1H, d, CONH). FABMS 計算値: C₂₂H₃₁N₄O₉ (MH⁺): *m/z* 541. 測定値: 541. 元素分析 計算値: C₂₂H₃₀N₄O₉•3/2H₂O•2/5CF₃COOH•1/5C₂H₅OC₂H₅; C, 47.05; H, 6.00; N, 8.92; F, 3.63. 測定値: C, 47.09; H, 5.85; N, 8.70; F, 3.42.

DTPA-D-Phe¹-octreotide

DTPA-D-Phe¹-octreotide は前章で述べた方法に従って合成した。

DTPA-D-Phe¹-octreotide の ¹¹¹In 標識

10 μ g の DTPA-D-Phe¹-octreotide、および trisodium citrate (4.91 mg)、citric acid (0.37 mg)、inositol (10.0 mg)、gentisic acid (2.0 mg) を含む超純水 (Milli Q, Millipore 社) の溶液 (0.5 mL) を凍結乾燥することにより、¹¹¹In 標識用キットを作製した。それぞれのキットに ¹¹¹InCl₃ (17.3 - 121.2 MBq) の 0.02 N HCl 溶液 (1 mL) を加え、1 時間、室温に放置した。ついで、逆相 HPLC による精製に

より、ペプチドに結合していない ^{111}In 、および、 ^{111}In とキレートを形成していない DTPA 結合ペプチドを除去した後、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドを含む画分に、DTPA-D-Phe¹-octreotide を適量加え、溶媒を減圧留去した。残渣に 0.1 % HSA を含む 10 mM HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH 7.6) を加え、体内放射能分布実験に対しては 0.1 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{L}$ 、血清中安定性、および、代謝実験、細胞内放射能分布実験に対しては 0.1 $\mu\text{g}/150\text{ }\mu\text{L}$ の濃度で DTPA-D-Phe¹-octreotide を含む溶液を調製した。放射化学的純度は逆相 HPLC、CAE により求めた。

^{111}In -DTPA-D-Phe、 ^{111}In -DTPA の調製

DTPA-D-Phe および DTPA の ^{111}In 標識を以下に示すように行った。即ち、10 μL の 1 M 酢酸ナトリウム水溶液に 40 μL の $^{111}\text{InCl}_3$ (0.37 - 0.74 MBq/ mL) の 0.02 N HCl 溶液を加えた。5 分間放置した後、20 μM の DTPA-D-Phe、または、DTPA の 20 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (pH 6.0) を含む生理食塩水溶液 10 μL に加え、室温で 1 時間インキュベートした。放射化学的純度は、逆相 HPLC、CAE により求めた。

さらに、 ^{111}In -DTPA-D-Phe の確認のために、DTPA-D-Phe を非放射性 In と反応させた。 $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3.4 mg) の 0.05 M 酢酸溶液 (100 μL) を DTPA-D-Phe (6.2 mg) の 0.05 M 酢酸溶液 (100 μL) に加えた。30 分間室温でインキュベートした後、FABMS、および、上述と同じ条件の逆相 HPLC で分析した。

血清中での安定性

^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の溶液 (1.5 μL , 1 ng, 71.7 kBq) を ddY 系雄性マウスの血漿 (400 μL) に加え、37 °C でインキュベートした。1、3 時間後に一部を取り出し、直ちに CAE により分析した。また、同時に、そのインキュベーション溶液の一部を分画分子量 10,000 の限外濾過膜 (Microcon-10, Amicon 社) で濾過し、逆相 HPLC により分析した。

In vivo 実験

体内放射能分布の実験は、1 群 5 匹の体重 28 - 30 g の 6 週齢 ddY 系雄性マウス (14) に ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の溶液 (100 μL , 0.1 μg) を尾静脈より投与して行った。投与 10、30 分、1、3、6、24 時間後に屠殺、採血、臓器を摘出し、それらの重量と放射能を測定した。また、マウスを代謝ケージ (メタボリカ MM 型、杉山元医理器社) で飼育し、投与直後から 24 時間後までに排泄された尿と糞便を採取し、それらの放射能を測定した。

マウスに投与して 1、3、24 時間後に腎臓に残存する放射能、および、投与直後から 24 時間後までに排泄された尿中の放射能を Arano らの方法 (15) に従い分析した。体重 28 - 30 g の 6 週齢 ddY 系雄性マウスに ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の溶液 (150 μL , 0.1 μg) を尾静脈より投与し、1、3、24 時間後に屠殺、開腹した後、大静脈より酵素阻害剤を含む緩衝液を灌流した。なお、緩衝液には 0.15 M NaCl と 0.02 % sodium azide、1 TIU/ mL aprotinin、2 mM benzamide-HCl、2 mM iodoacetamide、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、5 mM diisopropyl fluorophosphate を含む 0.1 M Tris-citrate 緩衝液 (pH 6.5) を用いた。腎臓を摘出し、試験管に入れ、ドライアイス-アセトン-バスにより凍結した後、室温に戻した。これを 3 回繰り返した後、氷上にて 35 mM β -octyl-glucoside を含む前述の緩衝液を 2.5 mL 加え、Polytron homogenizer (PT 10-35 型、Kinematica 社) を用いて 3 回最高速度で 30 秒間ホモジネートし、4 °C で 20 分間 48,000 g で遠心分離した。上清を沈殿から分離し、それぞれの放射能を測定して上清への放射能の抽出率を求めた。上清を孔径 0.45 μm のポリカルボン酸膜で濾過した。また、マウスを投与 24 時間後まで代謝ケージで飼育し、投与直後から 24 時間後までに排泄した尿を採取した。上述の方法で作製した腎臓ホモジネート上清、および、尿を、それぞれ CAE により分析した。さらに、それぞれの検体を分画分子量 10,000 の限外濾過膜 (Microcon-10) で濾過した後、逆相 HPLC により分析した。また、これらの検体に対しては、それぞれの分析方法により、別途作製した ^{111}In -DTPA、および、 ^{111}In -DTPA-D-Phe と同時分析を行った。

^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide をマウスに投与して 1 および 24 時間後に腎臓に

残存する放射能の細胞内分布を、Arano らの方法 (16)に従って分析した。体重 28 - 30 g の 6 週齢 ddY 系雄性マウスに ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の溶液 (150 μL , 0.1 μg)を尾静脈より投与し、1 および 24 時間後に屠殺、開腹した後、大静脈より 0.25 M sucrose を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)を灌流した。腎臓を摘出し、4 倍量の 0.25 M sucrose を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)を加え、氷冷下、Dounce homogenizer を用いて手動で 20 回ホモジナイズし、続いて、PotterElvehjem homogenizer を用いて 800 rpm で 2 回ホモジナイズした。得られた 20 % ホモジネートについて 4 °C、5 分間、340 g の遠心分離を 2 回施し、上清 (0.45 mL)を 0.25 M sucrose を含む 37.5 % Percoll (Pharmacia Biotech 社)の等張溶液 (9 mL, 1.08 g/mL) に加えた。4 °C、90 分間、20,000 g で遠心した後、得られた勾配 (1.02-1.06 g/mL)を 14 画分に分画し、それぞれの画分について、リソソームマーカー酵素である β -galactosidase (17)と膜画分のマーカー酵素である alkaline phosphodiesterase I (18)の活性および放射能を測定した。

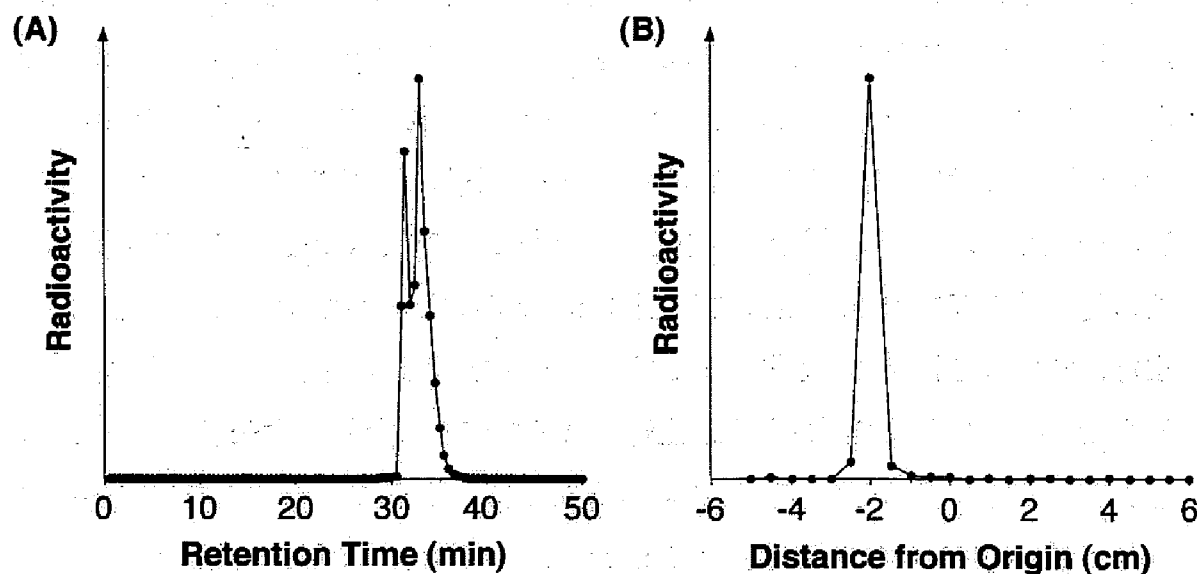


Figure 2-2. Radioactivity chromatograms of ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide by reversed-phase HPLC (A) and CAE (B).

第2項 結 果

DTPA-D-Phe¹-octreotide の ¹¹¹In 標識

逆相 HPLC、CAE の分析の結果、¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide の放射化学的純度は 96 %以上であった (Fig. 2-2)。また、以前の報告にある通り、¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide は、逆相 HPLC 分析で 2 本のピークを示した (19)。

¹¹¹In-DTPA-D-Phe、¹¹¹In-DTPA

逆相 HPLC、CAE の分析により、¹¹¹In-DTPA-D-Phe、¹¹¹In-DTPA が 97 %以上の放射化学的純度を有することを確認した。逆相 HPLC 分析において ¹¹¹In-DTPA-D-Phe は保持時間 5、10 分に 2 本のピークを示した。また、CAE 分析においては、¹¹¹In-DTPA-D-Phe は+ 2 cm の位置に単一のピークを示した。¹¹¹In-DTPA は逆相 HPLC 分析では保持時間 2 分に単一のピークを、CAE 分析では+ 2.5 cm の位置に単一のピークを示した。

In-DTPA-D-Phe の質量分析を行ったところ、正イオンとして 653 を、負イオンとして 651 を検出した。また、逆相 HPLC の溶出液を 254 nm の吸収波長で測定したところ、In-DTPA-D-Phe は保持時間 5、10 分に 2 本のピークを示した。また、In-DTPA-D-Phe の保持時間 5 分の成分を分取し、同じ条件の逆相 HPLC で分析したところ、保持時間 5、10 分に 2 本のピークを示した。同じことが、In-DTPA-D-Phe の保持時間 10 分の成分についても観察された。このことは、本条件下において In-DTPA-D-Phe が異性体で分離されることを示すと考えられる。

血清中安定性

¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide をマウス血清中において 37 °C で 3 時間インキュベートした後、逆相 HPLC で分析したところ、95.5 %が未変化体として存在した。CAE 分析においても同様の結果が得られた。

Table 2-1 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide in mice^a

Organs	Time after Administration					
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h
Blood	4.11 (0.50)	1.71 (0.14)	0.51 (0.07)	0.16 (0.01)	0.06 (0.01)	0.03 (0.01)
Liver	2.24 (0.13)	1.52 (0.32)	1.65 (0.55)	1.48 (0.32)	1.07 (0.51)	0.81 (0.04)
Kidney	20.24 (5.97)	22.90 (4.72)	19.73 (4.94)	16.91 (2.45)	13.96 (3.15)	2.93 (0.72)
Intestine	1.07 (0.16)	0.71 (0.07)	0.54 (0.12)	0.80 (0.10)	0.92 (0.18)	1.45 (0.62)
Spleen	2.04 (0.14)	1.70 (0.75)	1.48 (0.55)	2.06 (0.69)	1.22 (0.66)	1.17 (0.31)
Pancreas	2.31 (0.09)	1.16 (0.08)	0.59 (0.06)	0.35 (0.08)	0.31 (0.08)	0.15 (0.08)
Lung	4.82 (0.44)	2.78 (0.72)	1.18 (0.18)	0.76 (0.23)	0.55 (0.07)	0.39 (0.11)
Urine ^b						58.40 (2.66)
Feces ^b						19.00 (0.53)

^a Expressed as % injected dose per gram. Mean (s.d.) of five animals for each point.

^b Expressed as % injected dose (s.d.).

In vivo 実験

^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与した後の体内放射能分布を Table 2-1 に示す。血液中の放射能は速やかに消失し、腎臓では他の臓器と比べて最も高い放射能集積を示し、長時間にわたる放射能の滞留を示した。また、投与された放射能は主に尿中に排泄された。

腎臓に残存する放射能は、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与 1、3、24 時間後のいずれの時間においても、90 %以上の効率で腎臓ホモジネート上清に抽出された。Fig. 2-3 には、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与 1、3、24 時間後における腎臓のホモジネート上清と 24 時間後までに排泄された尿を逆相 HPLC で分析した結果を示す。腎臓において、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide は、保持時間の短い数種の化合物へと代謝され、時間とともに保持時間の長いものの割合が

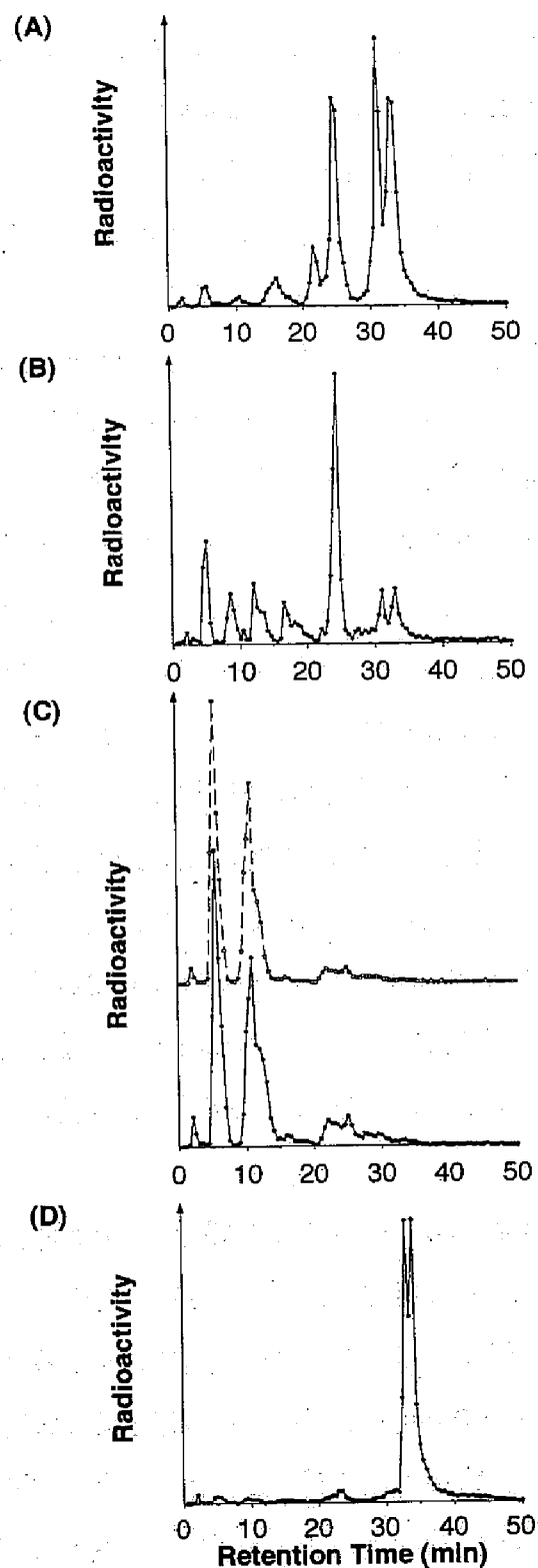


Figure 2-3. Reversed-phase HPLC radioactivity chromatograms of kidney homogenates at 1 (A), 3 (B), and 24h (C) and urine samples by 24 h (D) postinjection of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1$ -octreotide. The kidney homogenates at 24 h (C) were eluted in the absence (solid line) or in the presence (broken line) of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1$.

低下し、短いものの割合が増加した。そして、投与 24 時間後において腎臓に残存する主な放射能は、 ^{111}In -DTPA-D-Phe を標品として使用した同時分析により、 ^{111}In -DTPA-D-Phe と同じ保持時間を示すことが見いだされた。しかし、同時に、24 時間後においても、なお、数種の代謝物が存在していたが、これらの代謝物は保持時間から、octreotide と D-Phe との中間の長さを持つペプチドの ^{111}In -DTPA 結合体であると考えられる。また、投与 24 時間後までに排泄された尿では、未変化の ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同じ保持時間にほとんどの放射能が溶出された。腎臓ホモジネート上清を CAE により分析した場合にも、同様の結果が得られた。Table 2-2 には、逆相 HPLC による分析をもとに、腎臓、および、尿中の放射能を、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide (未変化体; 保持時間 31、33 分)、未変化の octreotide と D-Phe との間の長さをもつペプチドの ^{111}In -DTPA 結合体 (中間代謝物; 保持時間 13~27 分)、 ^{111}In -DTPA-D-Phe (最終代謝物; 保持時間 5.5、12 分)、その他 (最終代謝物より短い保持時間に溶出; ^{111}In -DTPA を含む) の 4 種類の画分に分類し、それらの割合を求めた結果を示す。その結果、投与 3 時間後の腎臓では、放射能の約 60 %が中間代謝物の画分に存在し、24 時間後の腎臓では、約 77 %が ^{111}In -DTPA-D-Phe の画分に存在した。また、尿中の放射能では、85 %以上が ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide、約 10 %が中間代謝物の画分にあり、 ^{111}In -DTPA-D-Phe の画分にはわずか 3 %程度しか存在していなかった。

Fig. 2-4 には、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与 24 時間後における腎臓のホモジネート上清、および、24 時間後までに排泄された尿を CAE により分析して得られた放射能クロマトグラムを示す。腎臓のクロマトグラムでは、2 本の放射能のピーク (- 0.5 cm, + 1.0 cm)が検出され、放射能の大部分は標品の ^{111}In -DTPA-D-Phe と同じ位置 (+ 1.0 cm)に存在していた。また、尿のクロマトグラムでは、2 本の放射能のピーク (- 2.0 cm, + 1.5 cm)が検出され、放射能の大部分は ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同じ位置 (- 2.0 cm)に存在していた。

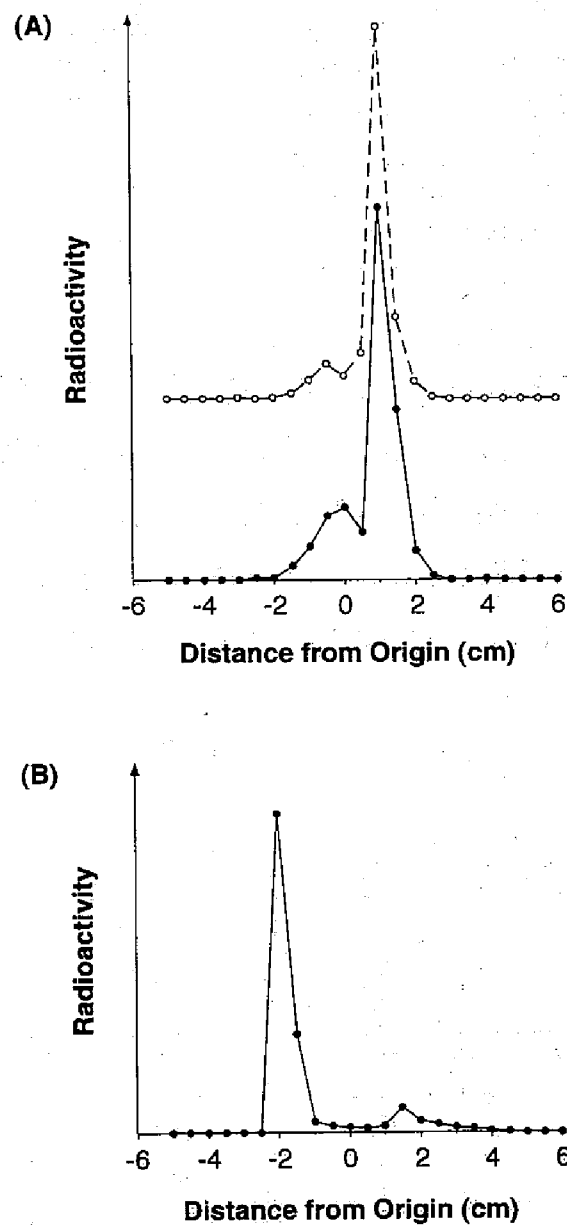


Figure 2-4. CAE radioactivity chromatograms of kidney homogenates at 24 h (A) and urine samples by 24 h (B) postinjection of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$. The kidney homogenates were co-analyzed in the absence (solid line) or in the presence (broken line) of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}$.

Table 2-2 Radiolabeled species in the kidney and urine after administration of ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide in mice

fraction	percentage of radioactivity ^a			
	kidney 1 h	kidney 3 h	kidney 24 h	urine 24 h
intact	58.08 (0.58)	20.03 (1.96)	1.87 (0.75)	85.46 (0.31)
intermediates	36.39 (0.44)	57.69 (0.38)	17.71 (0.23)	10.13 (0.22)
final metabolite	3.86 (0.04)	18.30 (0.61)	77.47 (0.35)	3.28 (0.13)
others ^b	0.56 (0.01)	0.99 (0.55)	2.36 (0.23)	0.99 (0.17)

^a Radiolabeled species in each fraction determined by reversed-phase HPLC analyses. Mean (s.d.) of three experiments. ^b Radiolabeled species eluted earlier times than those of ^{111}In -DTPA-D-Phe (e.g. ^{111}In -DTPA).

Fig. 2-5 には、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与 1、24 時間後における腎臓のホモジネートを、Percoll を用いた密度勾配遠心法により分画した結果を示す。いずれの腎臓ホモジネートも同様の放射能の分布を示し、大部分の放射能は約 1.10 g/mL の密度の画分に観察された。また、放射能の分布は、リソソームマーカ酵素である β -galactosidase の活性の分布とよく一致した。

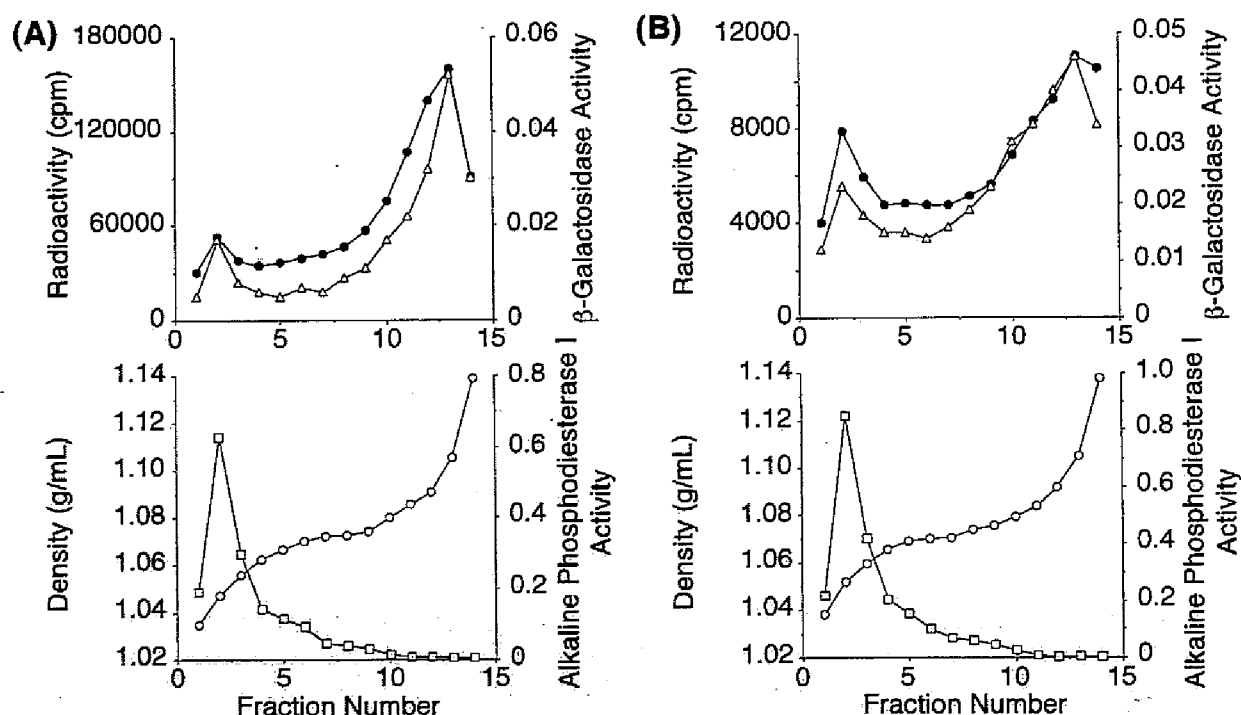


Figure 2-5. Subcellular fractionation of the kidney at 1 (A) and 24 h (B) postinjection of ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide in mice. Fractions were collected from the top of the gradient and assayed for radioactivity (●); lysosomal enzyme, β -galactosidase (Δ); plasma membrane enzyme, alkaline phosphodiesterase I (\square); density (\circ).

第3項 考 察

^{111}In -DTPA 結合ペプチドが腎細胞に取り込まれた後の放射能の挙動を詳細に検討するために、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide をマウスに投与後の、腎臓、および、尿中の放射能について検討した。 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide は、DTPA-D-Phe¹-octreotide を ^{111}In で標識した後、反応液から未標識 DTPA-D-Phe¹-octreotide を逆相 HPLC により除去して得た。

^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の逆相 HPLC、CAE による放射能クロマトグラムは、マウス血清とインキュベートしても、ほとんど変化しなかったことから、血清蛋白質との ^{111}In のトランスキレーションに対しては安定であることが示された。

マウスを使った体内放射能分布実験において、血液中から速やかに放射能が消失した (Table 2-1)。高い血清中安定性と速やかな血液中からの放射能消失 (Table 2-1) とから、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与した後、放射能は未変化体として腎臓やその他の臓器に移行したと考えられる。さらに、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide を投与して 1、24 時間後の腎臓は、同様の細胞内放射能分布を示し、放射能のほとんどはリソソーム画分に検出された (Fig. 2-5)。このことは、腎細胞に取り込まれた後、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide が速やかにリソソーム画分に輸送されることを示す (9)。

24 時間後に腎臓に残存する放射能を分析したところ、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide は腎臓で代謝されて、 ^{111}In -DTPA-D-Phe を生成することが示された (Figs. 2-3, 2-4)。また、Fig. 2-3、Fig. 2-4 から、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide は中間代謝物を經由して ^{111}In -DTPA-D-Phe に代謝されることが示されると同時に、投与 24 時間後においてもなお、中間代謝物が存在することが示された。

以上の検討結果、および、塩基性アミノ酸などの同時投与により ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の腎臓への取り込みが低減されるという報告 (7, 8, 20) とから、体内に投与された後の ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の挙動は、以下のものであると考えられる。即ち、投与後、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の大部分は未変化

体のまま糸球体濾過を受け、尿中に排泄される。しかし、糸球体濾過を受けた ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotideの一部が腎臓の実質細胞に再吸収され、速やかにリソソームに輸送され、おそらく D-Phe-L-Cys 配列を有するために、ゆっくりと ^{111}In -DTPA-D-Phe にまで代謝され、徐々にリソソーム画分から排泄されるものと考えられる。この結果は、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide 投与後の腎臓における長時間にわたる放射能滞留には、リソソームにおける緩徐な代謝速度と代謝物 ^{111}In -DTPA-D-Phe の腎細胞リソソームにおける高い滞留性が関与することを示唆している。したがって、腎臓での放射能の集積量を低減するためには、リソソームにおける代謝速度の増加、代謝物のリソソーム滞留性の低減が必要であることが示された。

第 2 節 $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体での腎臓における放射能滞留

前節の検討から、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 投与後に観察される腎臓での高い放射能の滞留は、腎細胞に取り込まれリソソームに輸送された後の緩徐な代謝速度と代謝物 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}$ の高い滞留性が関与していることが示唆された。そこで、本節では、代謝速度を増加させること、または、最終的な放射性代謝物のリソソーム滞留性を低減することにより、腎臓での放射能滞留を低減させることを計画した。

生体内においては、D-アミノ酸を含むペプチド結合よりも、L-アミノ酸だけからなるペプチド結合の方が速やかに分解される。そこで、代謝速度の増加による腎放射能滞留の低減を目的として、N 末端を L-Phe に置換した $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ を合成した。また、最近、二官能性キレート試薬として 2-(p-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (SCN-Bz-NOTA) を使用した ^{67}Ga 標識抗体フラグメントについて、マウスに投与後、腎臓に集積した ^{67}Ga 標識抗体フラグメントは代謝を受けて、 $^{67}\text{Ga-NOTA-Bz-SCN-L-Met}$ と $^{67}\text{Ga-NOTA-Bz-SCN-L-Lys}$ を生成したが、前者の細胞内滞留性は後者より有意に低いことが報告された (21, 22)。この結果は、金属キレートと L-Met との結合体が金属キレートとその他のアミノ酸との結合体とは異なり、腎臓からより排泄されやすい可能性があることを示唆する。そこで、代謝速度の上昇に加え、最終代謝物の滞留性の低減による腎放射能滞留の低減を目的とし、 $^{111}\text{In-DTPA}$ の結合する N 末端アミノ酸残基を L-Met に置換した $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ (Fig. 2-6) を合成した。

以下に、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ をマウスに投与した後の体内放射能挙動を $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ と比較した結果を示す。

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

$^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-L-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

$^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-L-Met-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

Figure 2-6. Structures of $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$, $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$, and $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$.

第 1 項 実験方法

機器・試薬

$^{111}\text{InCl}_3$ は日本メジフィジックス社より供給を受けた。1-*tert*-butyl hydrogen 3,6,9-tris((*tert*-butoxycarbonyl)methyl)-3,6,9-triazaundecanedioic acid (mDTPA) は前章の方法に従い合成した。逆相 HPLC には、前節と同様に、ナカライテスク社 Cosmosil 5C₁₈-MS (4.6 × 150 mm) を使用し、移動相には 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) とメタノールを用いた。 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ に対しては、流速 1.0 mL/min で、最初の 15 分間は 5 % メタノール、続く 10 分間でメタノールを 5 から 60 % へと直線勾配で増加させ、最後の 25 分間を 60 % メタノールで溶出した。 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ に対しては、流速 1.0 mL/min で、最初の 10 分間は 0 % メタノール、続く 10 分間でメタノールを 0 から 45 % へと直線勾配で増加させ、最後の 25 分間を 45 % メタノールで溶出した。CAE は、前節と同様に、Joko 社 Separax を用い、veronal 緩衝液 (イオン強度 0.06, pH 8.6) 中、0.8 mA/cm で行い、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ では 40 分間、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ では 50 分間泳動した。 $^1\text{H-NMR}$ は、tetramethylsilane を内部標準物質として Varian

社製 VXR 200 (200 MHz)で測定した。高速原子衝撃質量分析法 (FABMS)には Micromass 社製 VG70-SE を用いた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOFMS)には PerSeptive Biosystems 社 Voyager-DE RP を用いた。DTPA 結合 octreotide 誘導体のアミノ酸分析は、前章に述べた方法と同様にして行った。試薬にはすべて特級試薬を用いた。

DTPA-L-Phe

溶媒にアセトニトリルを用い、前節に示す DTPA-D-Phe の合成方法と同様に、L-phenylalanine *tert*-butyl ester hydrochloride (199 mg, 0.818 mmol)と mDTPA (253 mg, 0.409 mmol)を縮合し、97.7 mg (29.1 %)の DTPA(*t*Bu)₄-L-Phe-O*t*Bu を淡黄色油状物質として得た。

DTPA-D-Phe の合成方法と同様に、DTPA(*t*Bu)₄-L-Phe-O*t*Bu を TFA-anisole で処理し、41.8 mg (81.3 %)の DTPA-L-Phe を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.84 - 3.17 (10H, m, CH₂CH₂, CH₂C₆H₅), 3.26 (2H, s, NCH₂CO), 3.29 (2H, s, NCH₂CO), 3.47 (4H, s, NCH₂CO), 3.77 (2H, s, NCH₂CO), 4.41 - 4.50 (1H, m, NHCH), 7.16 - 7.30 (5H, m, aromatic), 8.24 (1H, d, CONH). FABMS 計算値: C₂₂H₃₁N₄O₉ (MH⁺): *m/z* 541. 測定値: 541. 元素分析 計算値: C₂₂H₃₀N₄O₉•H₂O•3/10CF₃COOH•1/4C₂H₅OC₂H₅; C, 48.17; H, 6.04; N, 9.11; F, 3.09. 測定値: C, 48.19; H, 6.01; N, 9.20; F, 2.91.

DTPA-L-Met

DTPA-L-Met は mDTPA を用いて以下に示すように合成した。L-methionine *tert*-butyl ester hydrochloride (198 mg, 0.819 mmol)を DMF (3 mL)に溶解し、氷冷下、*N,N*-diisopropylethylamine (0.143 mL, 0.819 mmol)を加えた後、室温で 30 分間攪拌した。再び氷冷し、1-hydroxybenzotriazole monohydrate (151 mg, 1.117 mmol)、および、1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (214 mg, 1.117 mmol)、*N,N*-diisopropylethylamine (0.195 mL, 1.117 mmol)、mDTPA (460 mg, 0.745 mmol)の DMF 溶液 (2 mL)を加え、その後室温で 6 時間攪拌した。反応溶液を

酢酸エチル (60 mL)で抽出した後、有機層を 10 % クエン酸水溶液 (60 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (60 mL)、飽和食塩水 (60 mL)でそれぞれ 3 回ずつ洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した後、残渣を酢酸エチル : ヘキサン (3 : 2)を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、272 mg (45.4 %)の DTPA(Bu)₄-L-Met-O'Bu を淡黄色油状物質として得た。

DTPA(Bu)₄-L-Met-O'Bu (64.3 mg, 0.080 mmol)に thioanisole (289 μ L, 2.372 mmol)、および、*m*-cresol (0.167 mL, 1.598 mmol)、1,2-ethanedithiol (0.402 mL, 4.792 mmol)を加え、次いで 0 °C 以下で TFA (5.3 mL)を加えた。30 °C で 7 時間攪拌し、減圧留去により TFA を除去した後、5 mL の乾燥ジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させた。これを 3 回繰り返す、30.4 mg (72.6 %)の DTPA-L-Met を白色固体として得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.91 - 2.02 (2H, m, CHCH₂CH₂), 2.04 (3H, s, CH₃), 2.45 (2H, br, CH₂S), 2.98 (4H, br, CH₂CH₂), 3.22 (4H, br, CH₂CH₂), 3.38 (2H, s, NCH₂CO), 3.45 (2H, s, NCH₂CO), 3.49 (4H, s, NCH₂CO), 4.00 (2H, s, NCH₂CO), 4.34 (1H, q, NHCH), 8.28 (1H, d, NH). FABMS 計算値: C₁₉H₃₃N₄O₁₁S (MH⁺): *m/z* 525.1867. 測定値: 525.1907.

DTPA-L-Phe¹-octreotide

DTPA-L-Phe¹-octreotide は、Fmoc-D-Phe-OH の代わりに Fmoc-L-Phe-OH を使用し、DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様にして合成した。

アミノ酸組成比: Thr \times 1, 1.03; Phe \times 2, 2.00; Lys \times 1, 1.10. MALDI-TOFMS 計算値: C₆₃H₈₈N₁₃O₁₉S₂ (MH⁺), *m/z* 1394.57. 測定値; 1394.94.

DTPA-L-Met¹-octreotide

DTPA-L-Met¹-octreotide は、Fmoc-D-Phe-OH の代わりに Fmoc-L-Met-OH を使用し、DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様にして合成した。また、ヨウ素酸化は、80 % メタノール中でなく、80 % 酢酸中に行った。

アミノ酸組成比: Thr × 1, 0.99; Met × 1, 1.04; Phe × 1, 1.00; Lys × 1, 1.01.
MALDI-TOFMS 計算値: C₅₉H₈₈N₁₃O₁₉S₃ (MH⁺), *m/z* 1379.59. 測定値; 1379.46.

DTPA-L-Phe¹-octreotide、および、DTPA-L-Met¹-octreotide の ¹¹¹In 標識

前節と同様に、10 μg の DTPA-L-Phe¹-octreotide、または、DTPA-L-Met¹-octreotide を含む ¹¹¹In 標識用キットを作製し、これに ¹¹¹InCl₃ (17.3 - 121.2 MBq) の 0.02 N HCl 溶液 (1 mL) を加えて ¹¹¹In 標識を行った。ついで、前節と同様に、逆相 HPLC によって精製し、体内放射能分布実験に対しては 0.1 μg/ 100 μL、血清中安定性、および、代謝実験に対しては 0.1 μg/ 150 μL の DTPA-octreotide 誘導体を含む溶液を調製した。放射化学的純度は、逆相 HPLC、CAE により求めた。

¹¹¹In-DTPA-L-Phe、¹¹¹In-DTPA-L-Met、¹¹¹In-DTPA の調製

DTPA-L-Phe、DTPA-L-Met、DTPA の ¹¹¹In 標識は前節と同様に行った。放射化学的純度は、逆相 HPLC、CAE により求めた。

血清中での安定性

前節と同様にして、それぞれの ¹¹¹In-DTPA-octreotide 誘導体について、CAE、逆相 HPLC により検討した。

In vivo 実験

体内放射能分布、体外排泄放射能は、前節と同様にして検討した。

マウスに投与 1、3、24 時間後に腎臓に残存する放射能、および、投与直後から 24 時間後までに排泄された尿中の放射能を、前節と同様にして、CAE、逆相 HPLC により分析した。また、それぞれの分析方法により、別途作製した ¹¹¹In-DTPA、および、¹¹¹In-DTPA-L-Phe、または、¹¹¹In-DTPA-L-Met の共存下で分析を行った。

また、マウスに投与して 1 および 24 時間後に腎臓に残存する放射能の細胞内分布を、前節と同様にして分析した。

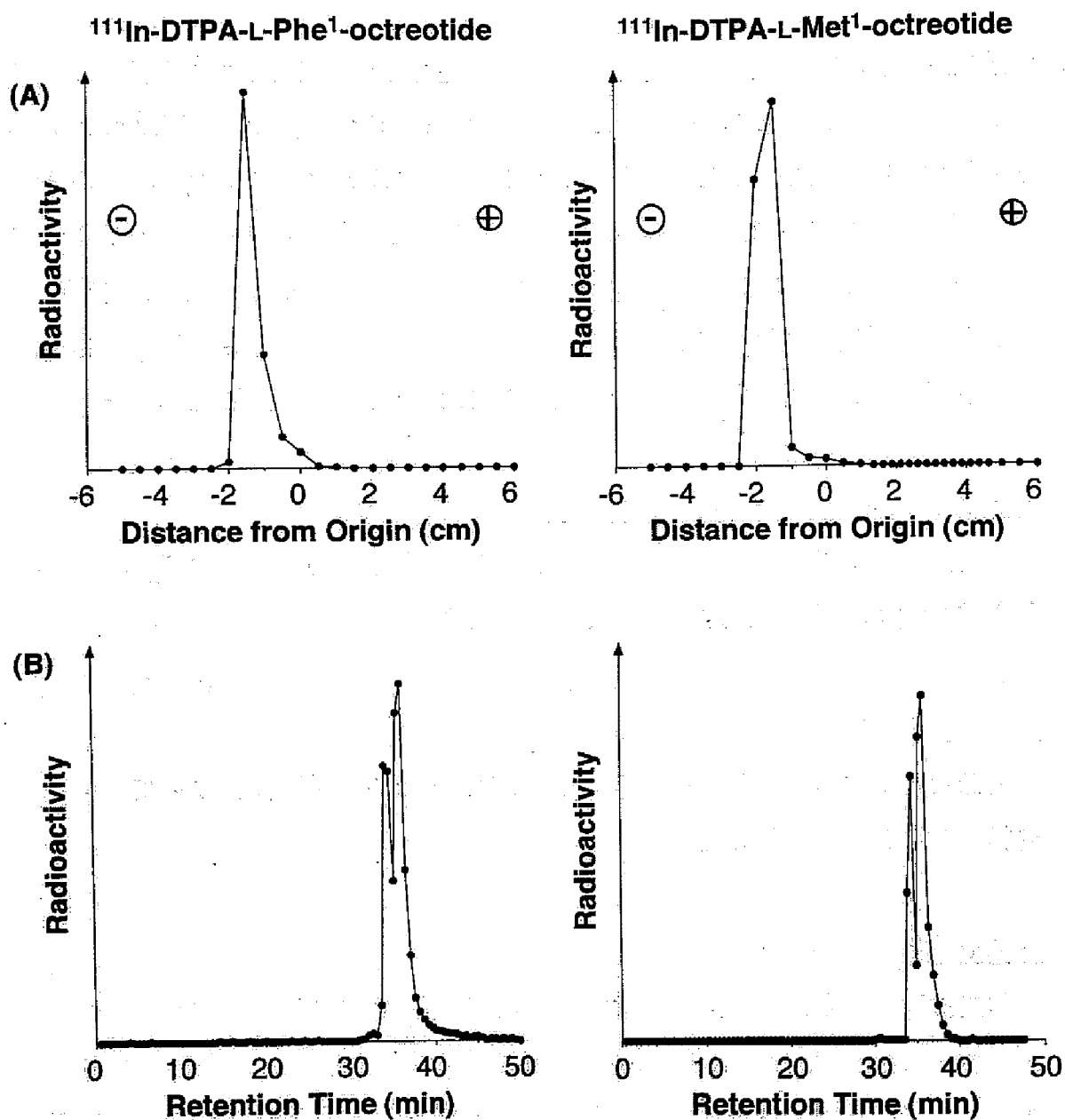


Figure 2-7. CAE (A) and reversed-phase HPLC (B) radiochromatograms of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide.

第2項 結 果

^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、および、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide

逆相 HPLC、CAE により分析したところ、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide の放射化学的純度は、いずれも 95 %以上であった (Fig. 2-7)。

^{111}In -DTPA-L-Phe、 ^{111}In -DTPA-L-Met、 ^{111}In -DTPA

逆相 HPLC、CAE により分析した結果、 ^{111}In -DTPA-L-Phe、 ^{111}In -DTPA-L-Met、 ^{111}In -DTPA は 96 %以上の放射化学的純度を有することが示された。逆相 HPLC 分析において、 ^{111}In -DTPA-L-Phe は保持時間 6、11 分に、 ^{111}In -DTPA-L-Met は保持時間 2.5、4.5 分に 2 本のピークを示した。また、CAE 分析においては、 ^{111}In -DTPA-L-Phe、 ^{111}In -DTPA-L-Met は共に、+ 2 cm の位置に単一のピークを示した。 ^{111}In -DTPA は、逆相 HPLC 分析では ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide に対する条件下において保持時間 2 分に、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide に対する条件下において保持時間 2.5 分に単一のピークを示し、CAE 分析では、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide に対する条件下において + 3.0 cm の位置に、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide に対する条件下において + 3.5 cm の位置に単一のピークを示した。

血清中安定性

マウス血清中において 37 °C で 3 時間インキュベートし、逆相 HPLC で分析したところ、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide のいずれの場合も、放射能の 96.5 %以上が未変化体として観察され、両者は血清中において、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様に安定であることが示された。また、同様の結果が CAE による分析でも認められた。

Table 2-3 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide in mice^a

Organs	Time after Administration					
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h
Blood	4.49 (0.25)	2.02 (0.38)	0.53 (0.11)	0.08 ^c (0.01)	0.05 (0.01)	0.03 (0.01)
Liver	2.06 (0.17)	1.85 (0.37)	1.26 (0.13)	1.48 (0.24)	1.50 (0.47)	0.81 (0.13)
Kidney	17.71 (4.05)	18.28 (2.99)	15.89 (3.45)	12.82 ^c (1.80)	9.44 (1.80)	2.83 (1.00)
Intestine	0.91 (0.05)	0.72 (0.11)	0.66 (0.24)	0.67 (0.10)	1.03 (0.31)	0.87 (0.54)
Spleen	3.18 (0.95)	2.23 (0.57)	1.74 (0.62)	1.88 (0.58)	1.31 (0.54)	1.21 (0.82)
Pancreas	1.67 ^d (0.29)	1.04 (0.17)	0.43 ^c (0.03)	0.20 ^c (0.04)	0.14 ^c (0.05)	0.16 (0.01)
Lung	4.74 (0.63)	2.59 (0.27)	0.85 (0.08)	0.47 (0.16)	0.33 (0.12)	0.27 (0.05)
Urine ^b						57.54 (5.64)
Feces ^b						22.81 (4.08)

^a Expressed as % injected dose per gram. Mean (s.d.) of five animals for each point.

^b Expressed as % injected dose (s.d.). Differences between ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide were analyzed by the unpaired Mann-Whitney test (^c $p < 0.05$, ^d $p < 0.01$).

In vivo 実験

^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide をマウスに投与後の体内放射能分布を Tables 2-3、2-4 にまとめた。いずれの誘導体も血液中からの速やかな放射能消失を示し、また、投与 10 分から 24 時間後まで ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様の体内放射能分布を示した。検討したすべての時間での腎臓内放射能、24 時間後までに排泄された尿、糞便中での放射能は、いずれも ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の場合と比較して、有意差は認められなかった。

腎臓に残存する放射能は、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide を投与して 1、3、24 時間後のいずれの時間においても 90 %以上の効率で腎臓ホモジネート上清に抽出された。Fig. 2-8 には、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide を投与して 1、3、24 時間後における腎

Table 2-4 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide in mice^a

Organ	Time after Administration					
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h
Blood	3.80 ^d (0.39)	1.64 (0.51)	0.49 (0.21)	0.14 ^d (0.03)	0.11 ^{c, d} (0.00)	0.08 ^{c, d} (0.03)
Liver	1.88 ^c (0.29)	1.80 (0.42)	1.16 (0.17)	1.58 (0.41)	1.50 (0.27)	0.81 (0.36)
Kidney	20.72 (6.07)	18.99 (1.83)	18.03 (3.48)	13.69 (1.03)	12.78 (1.75)	4.85 (2.34)
Intestine	0.74 ^c (0.11)	0.50 (0.17)	0.36 (0.14)	0.20 ^{c, d} (0.03)	0.24 ^{c, d} (0.05)	0.22 ^{c, d} (0.06)
Spleen	1.76 ^d (0.39)	2.29 (0.78)	1.11 (0.21)	2.09 (1.03)	1.55 (0.58)	1.42 (0.97)
Pancreas	1.11 ^{c, d} (0.17)	0.63 ^{c, d} (0.17)	0.20 ^c (0.17)	0.07 ^{c, d} (0.04)	0.03 ^{c, d} (0.02)	0.18 (0.21)
Lung	2.87 ^c (0.27)	1.48 ^{c, e} (0.39)	0.50 ^{c, d} (0.21)	0.14 ^{c, d} (0.03)	0.11 ^{c, d} (0.03)	0.06 ^{c, d} (0.03)
Urine ^b						62.93 (5.33)
Feces ^b						25.33 (6.20)

^a Expressed as % injected dose per gram. Mean (s.d.) of four to five animals for each point. ^b Expressed as % injected dose (s.d.). Differences between ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide were analyzed by the unpaired Mann-Whitney test (^c $p < 0.05$). Differences between ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide were analyzed by the unpaired Mann-Whitney test (^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$).

臓のホモジネート上清と 24 時間後までに排泄された尿を CAE により分析して得られた放射能クロマトグラムを示す。腎臓のホモジネートについては、いずれの場合も、投与時間と共に放射能ピークが約 -1.5 cm から約 +2.0 cm へと移動した。一方、尿中放射能の大部分は未変化体と同じ位置に観察された。また、投与 3、24 時間後の腎臓ホモジネートでは、原点に少量の放射能が観察された。同様の結果が、TLC による分析においても観察された。

Fig. 2-9 には、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide を投与して 1、3、24 時間後における腎臓のホモジネート上清と 24 時間後までに排泄された尿を逆相 HPLC により分析した結果を示す。いずれの ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の場合も、腎臓のホモジネートにおいて、投与後の時間の経過とともに

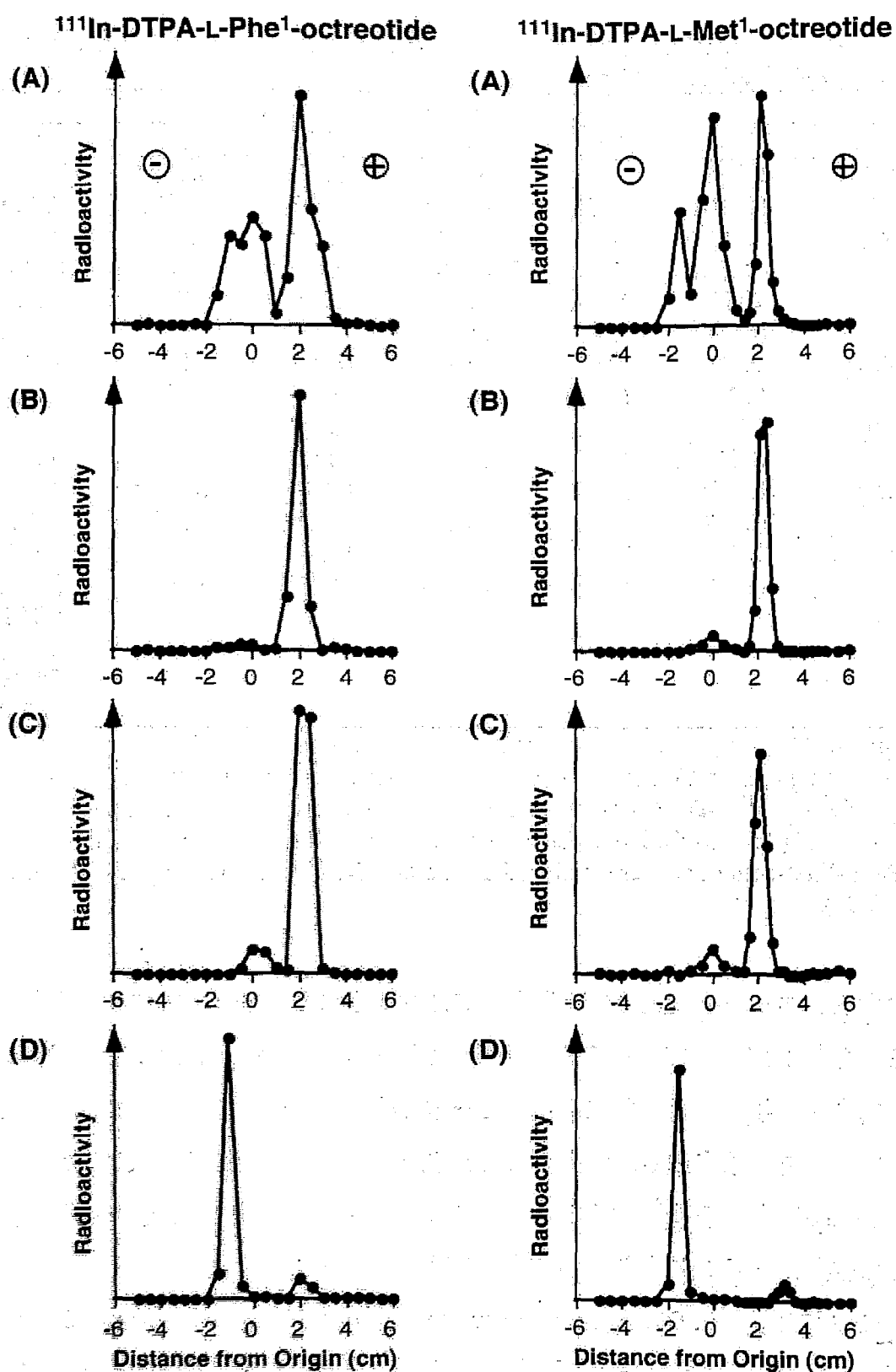


Figure 2-8. CAE radiochromatograms of kidney homogenates at 1 (A), 3 (B), and 24 h (C) postinjection and urine samples (D) excreted by 24 h postinjection of $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ and $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$.

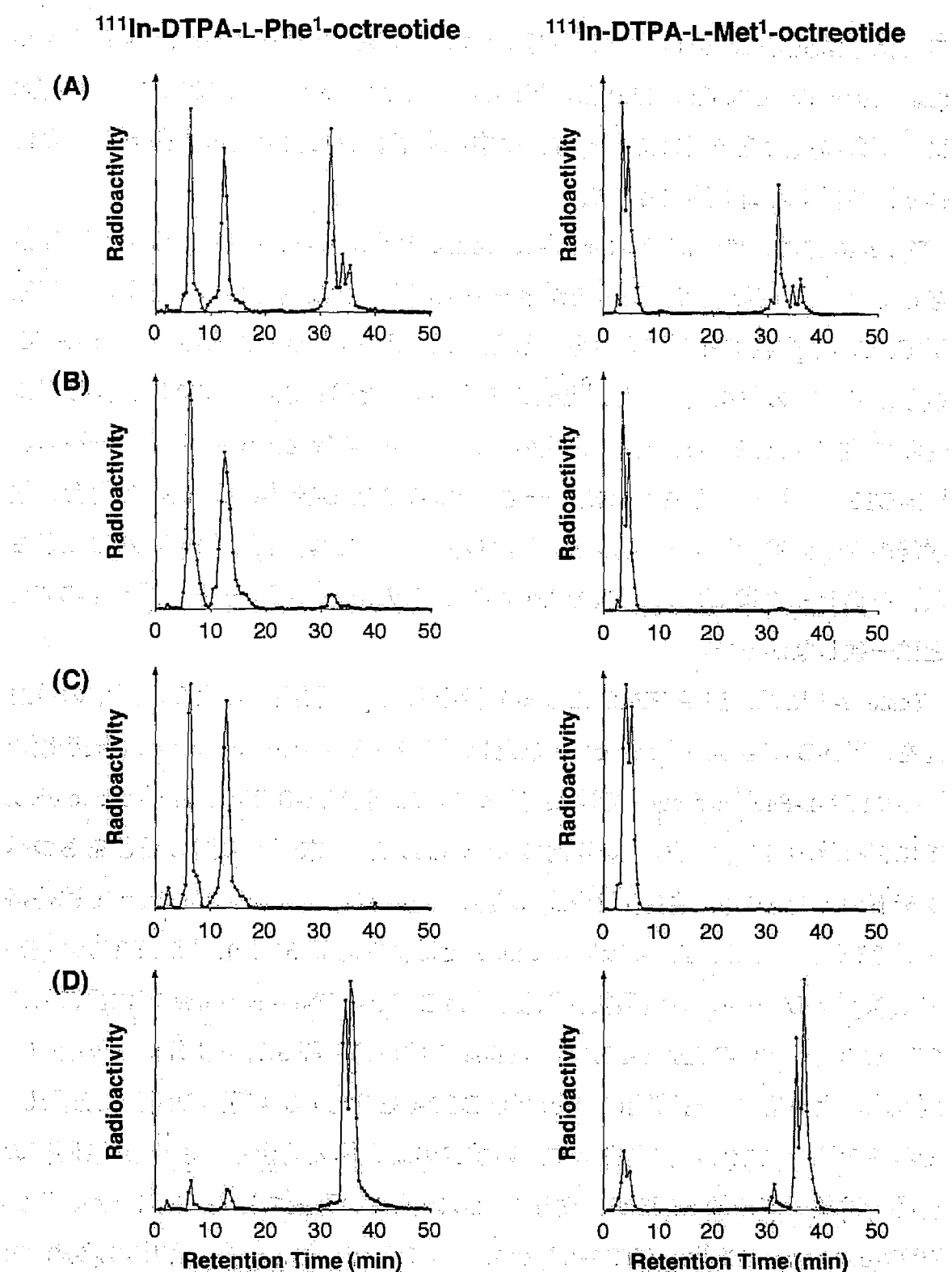


Figure 2-9. Reversed-phase HPLC radiochromatograms of kidney homogenates at 1 (A), 3 (B), and 24 h (C) postinjection and urine samples (D) excreted by 24 h postinjection of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide.

未変化体は急速に減少し、3 時間以降では、保持時間が短い画分 ($^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ では 6.5、13.0 分、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ では 3.5、4.5 分) に大部分の放射能を認めた。一方、尿中に排泄された放射能の大部分は未変化体と同じ保持時間に溶出された。

Fig. 2-10 には、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ と $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ を投与して 1、24 時間後の腎臓ホモジネート上清を、代謝物標品の存在下、非存在下で、CAE、逆相 HPLC により分析した結果を示す。 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ 投与後の腎臓の主な放射能は $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ と同じ位置、または、同じ保持時間に観察され、そのピークは標品の $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ との同時分析で一致し、 $^{111}\text{In-DTPA}$ とは一致しなかった。一方、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ の場合、放射能の大部分は $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ と同じ位置、または、同じ保持時間に観察され、そのピークは標品の $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ との同時分析で一致し、 $^{111}\text{In-DTPA}$ とは一致しなかった。

Table 2-5 には、逆相 HPLC による分析をもとに、腎臓、および、尿中の放射能を、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ または $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ (未変化体; $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 34、35 分、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 35、36 分)、未変化の octreotide と N 末端との間の長さをもつペプチドの $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合体 (中間代謝物; $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 32 分、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 32 分)、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ または $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ (最終代謝物; $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 6.5、13.0 分、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ では保持時間 3.5、4.5 分)、その他 (最終代謝物より短い保持時間に溶出; $^{111}\text{In-DTPA}$ を含む) の 4 種類の画分に分類し、それらの割合を求めた結果を示す。いずれの誘導体の場合も、投与 1 時間後の腎臓では放射能の約 55 %が、投与 3、24 時間後の腎臓では 90 %以上が、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ または $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ の画分に存在した。一方、尿中の放射能では、いずれの場合も、約 10 %が $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ または $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ の画分に、80 %以上が $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ または $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ の画分に存在した。

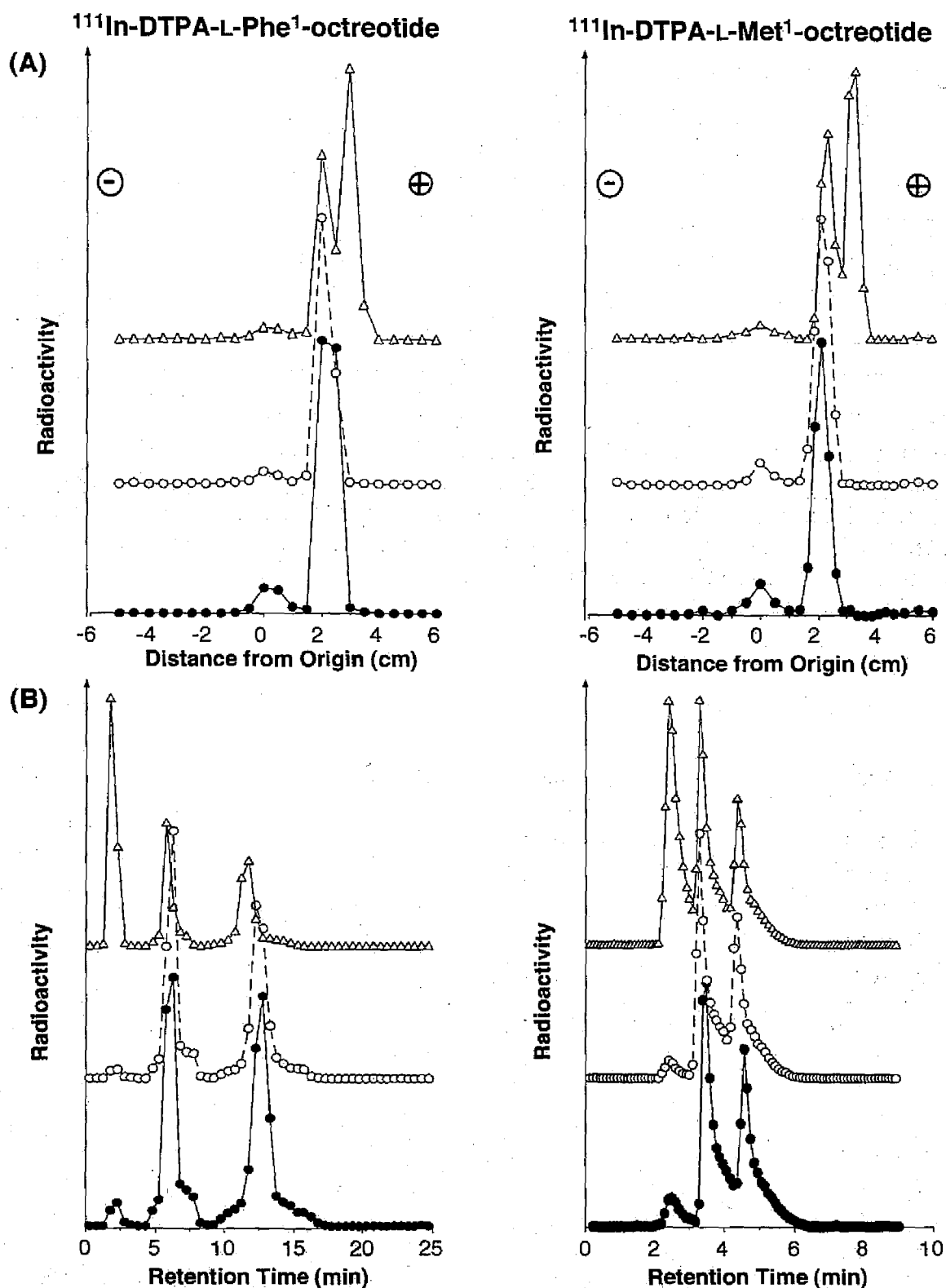


Figure 2-10. CAE (A) and reversed-phase HPLC (B) radiochromatograms of kidney homogenates at 24 h postinjection of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide. The kidney homogenates were analyzed in the absence (closed circle, solid line) or in the presence (open circle, broken line) of ^{111}In -DTPA-L-Phe or ^{111}In -DTPA-L-Met for ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide or ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide, respectively. The kidney homogenates were also analyzed in the presence of ^{111}In -DTPA (open triangle, solid line).

Table 2-5 Radiolabeled species in the kidney and urine after administration of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide in mice

fraction	percentage of radioactivity ^a			
	kidney (1 h)	kidney (3 h)	kidney (24 h)	urine (24 h)
^{111}In -DTPA-L-Phe ¹ -octreotide				
intact	14.36 (0.26)	0.67 (0.52)	0.15 (0.22)	85.41 (1.83)
intermediates	25.77 (0.62)	3.88 (0.21)	0.00 (0.01)	3.04 (0.26)
final metabolism	57.14 (0.69)	93.65 (0.42)	96.55 (0.03)	9.54 (0.77)
others ^b	0.65 (0.04)	0.54 (0.02)	3.17 (0.20)	1.34 (0.22)
^{111}In -DTPA-L-Met ¹ -octreotide				
intact	10.76 (1.21)	0.20 (0.04)	0.15 (0.10)	80.32 (5.66)
intermediates	29.68 (2.47)	1.81 (0.02)	0.39 (0.11)	6.79 (0.30)
final metabolism	54.90 (4.03)	94.93 (0.14)	91.23 (0.19)	10.75 (4.69)
others ^b	2.38 (0.18)	2.45 (0.01)	7.07 (0.01)	0.94 (0.67)

^a Radiolabeled species in each fraction determined by reversed-phase HPLC analyses. Mean (s.d.) of three experiments. ^b Radiolabeled species eluted at earlier retention times than those of ^{111}In -DTPA-L-Phe or ^{111}In -DTPA-L-Met (e.g. ^{111}In -DTPA).

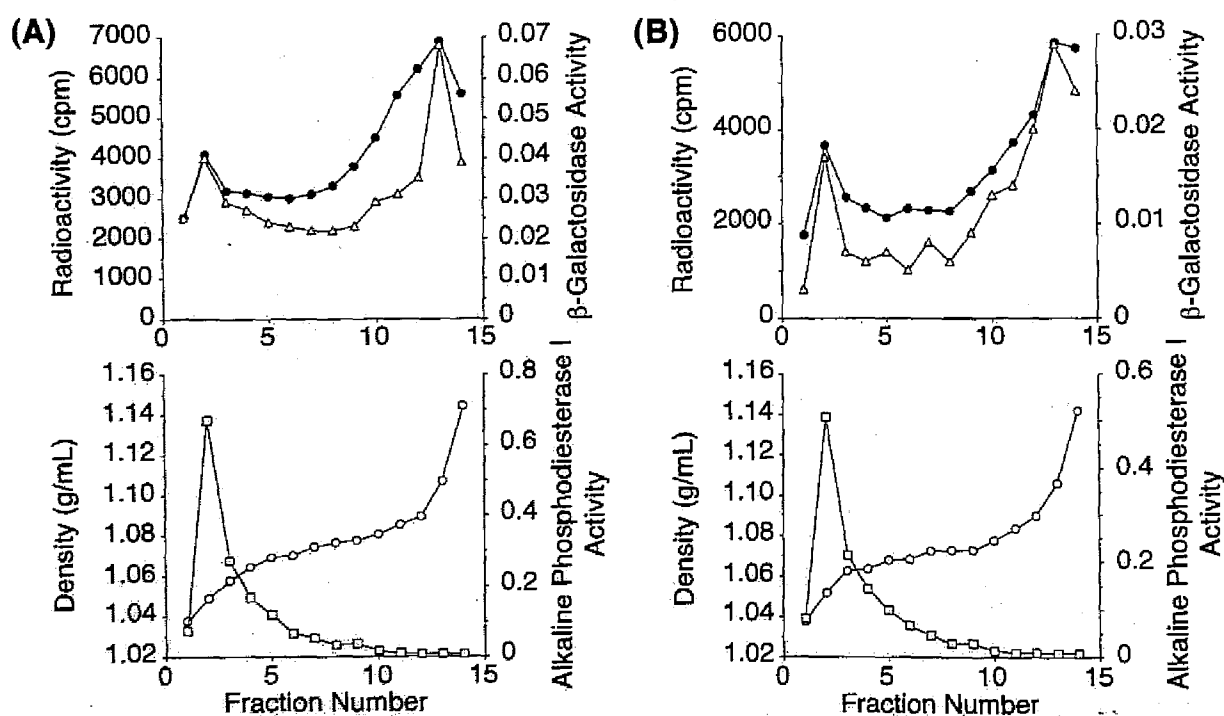


Figure 2-11. Subcellular fractionation of the kidney at 1 (A) and 24 h (B) postinjection of ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide in mice. Fractions were collected from the top of the gradient and assayed for radioactivity (●); lysosomal enzyme, β -galactosidase (Δ); plasma membrane enzyme, alkaline phosphodiesterase I (\square); density (\circ).

Fig. 2-11 には、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide を投与して 1、24 時間後における腎臓のホモジネートを、Percoll を用いた密度勾配遠心法により分画した結果を示す。いずれの腎臓ホモジネートも同様の放射能分布を示し、大部分の放射能は約 1.10 g/mL の密度の画分に観察された。また、放射能の分布は、リソソームのマーカー酵素である β -galactosidase の活性の分布とよく一致した。 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide の場合にも同様の結果が得られた。

第 3 項 考 察

本節においては、リソソームでの代謝速度の増加による腎放射能滞留の低減を目的として ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide を合成した。また、最近、金属キレートと L-Met との結合体の腎細胞内滞留性が他のアミノ酸との結合体と比べて低いことを示唆する報告 (21, 22) があったことから、代謝速度の増加に加え、最終的な代謝物のリソソームでの滞留性の低減による腎放射能滞留の低減を目的として ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide を合成した。そして、それらの体内放射能挙動を ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比較検討した。

^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide と ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide はいずれも ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様、血液中からの速やかな放射能消失を示し (Tables 2-3, 2-4)、投与 3 時間後の血液中放射能は、いずれの場合も僅かに 0.1 % injected dose/g 程度であった。また、両化合物共に、投与 10 から 30 分に腎臓で最も高い放射能集積量を示し、それは ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同程度であった。さらに、in vitro の検討において血清中で非常に安定であることが示されたことから、両誘導体ともに、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様に主に糸球体濾過を受けた後に未変化体のまま腎細胞に取り込まれたと考えられる。また、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Met¹-octreotide を投与して 1、24 時間後の腎臓は、同様の細胞内放射能分布を示し、放射能のほとんどはリソソーム画分に検出された (Fig. 2-11)。このことから、腎細胞に取り込まれた後、両誘導体

が $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ と同様に速やかにリソソーム画分に輸送されることが示された。また、代謝物分析実験の結果から、所期の通り、二つの誘導体が腎臓において同様の速さで $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ より速やかに、それぞれ $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ にまで代謝されることが示された (Figs. 2-8~2-10, Table 2-5)。CAE と TLC の分析結果はまた、リソソームにおける ^{111}In の蛋白質へのトランスキレーションがほとんど無いことを示している。したがって、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ を投与後の腎臓での放射能は、それぞれ、腎リソソーム内に残存する $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ の量を反映していると考えられる。

一方、体内分布実験の結果、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ を投与して 10 分から 24 時間後まで、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ とほぼ同等の腎放射能レベルが観察された (Table 2-3)。このことから、腎臓での放射能滞留は代謝速度にはあまり影響されず、最終的な代謝物である $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ のリソソーム滞留性に依存すると考えられる。さらに、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1\text{-octreotide}$ の場合にも、投与して 10 分から 24 時間後まで、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ とほぼ同等の腎放射能集積量が観察され (Table 2-4)、放射能滞留を低減することができなかった。このことから、腎臓での放射能滞留は代謝速度にはあまり影響されず、最終的な代謝物のリソソーム滞留性に依存することに加え、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}$ と $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}$ とが同様の腎細胞内滞留性を有することが示された。また、これまでに行われた $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合蛋白質の代謝研究から、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Lys}$ や $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}$ が長時間組織に滞留することも報告されている (23-26)。したがって、これらの報告と今回得られた結果を総合すると、 $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体だけでなく、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドにおいて、投与後の腎リソソームにおける $^{111}\text{In-DTPA}$ とアミノ酸との結合体の高い滞留性は、 $^{111}\text{In-DTPA}$ の性質に由来し、アミノ酸部分に影響されないものと考えられた。

以上、 $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体投与後の腎臓での放射能滞留は、リソソームにおける代謝速度の増加や最終的な代謝物である $^{111}\text{In-DTPA}$ と N 末端アミノ

酸との結合体のアミノ酸部分の置換によって低減することが困難であることが示された。この理由は、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体投与後の腎臓での放射能滞留が代謝速度にはほとんど影響されず、最終代謝物である ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体の滞留性に基つき、その滞留性が N 末端アミノ酸には影響されないことであると考えられた。

本章の結果より、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の腎臓での放射能滞留は、最終代謝物である ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体の高いリソソーム滞留性に基つき、その滞留性は N 末端アミノ酸には影響されないことが明らかとなった。したがって、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドにおいて、いったん腎臓の細胞内取り込まれた放射能を細胞外へ排泄させるのは困難と考えられた。また、 ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体は標的組織においても長時間滞留する可能性が考えられることから、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体のように標的細胞で内在化される場合、腎細胞への取り込みのみを抑えることが、腎放射能集積量を低減した理想的な放射能分布を与える有効な方法となると考えられた。

引用文献

- 1) Krenning, E. P., Bakker, W. H., Kooij, P. P. M., Breeman, W. A. P., Oei, H. Y., de Jong, M., Reubi, J. C., Visser, T. J., Bruns, C., Kwekkeboom, D. J., Reijs, A. E. M., van Hagen, P. M., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1992) Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe¹-octreotide in man: Metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr³-octreotide. *J. Nucl. Med.*, **33**, 652-658.
- 2) Bakker, W. H., Krenning, E. P., Reubi, J.-C., Breeman, W. A. P., Setyono-Han, B., de Jong, M., Kooij, P. P. M., Bruns, C., van Hagen, P. M., Marbach, P., Visser, T. J., Pless, J., and Lamberts, S. W. J. (1991) In vivo application of [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci.*, **49**, 1593-1601.
- 3) Krenning, E. P., Kwekkeboom, D. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Kooij, P. P. M., Oei, H. Y., van Hagen, P. M., Postema, P. T. E., de Jong, M., Reubi, J. C., Visser, T. J., Reijs, A. E. M., Hofland, L. J., Koper, J. W., and Lamberts, S. W. J. (1993) Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: The Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.*, **20**, 716-731.
- 4) Krenning, E. P., Kooij, P. P. M., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Postema, P. T. E., Kwekkeboom, D. J., Oei, H. Y., de Jong, M., Visser, T. J., Reijs, A. E. M., and Lamberts, S. W. J. (1994) Radiotherapy with a radiolabeled somatostatin analogue, [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide. A case history. *Ann. NY Acad. Sci.*, **733**, 496-506.
- 5) 井上 登美夫, 大竹 英則, 平野 恒夫, 富吉 勝美, 遠藤 啓吾, 田中 孝司, 清水 直容, 斎藤 達雄 (1995) ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotideの安全性、薬物動態、被曝線量の検討 —第1相臨床試験報告—. *核医学*, **32**, 511-521.
- 6) 山本 和高, 石井 靖, 古舘 正從, 伊藤 和夫, 塚本 江利子, 金丸 龍之介, 遠藤 啓吾, 平野 恒夫, 田中 孝司, 荻野 良郎, 宇野 公一, 久保 敦司, 橋本 順, 日下部 きよ子, 牧 正子, 佐々木 康人, 瀬戸 光, 利波 紀久, 石垣 武男, 中川 毅, 松下 智人, 小西 淳二, 阪原 晴海, 長谷川 義尚, 池窪 勝治, 渡邊 祐司, 濱本 研, 増田 康治, 中條 政敬, 中別府 良昭, 鳥塚 莞爾 (1995) ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide の消化管ホルモン産生

腫瘍を対象とした第Ⅲ相臨床試験. 核医学, **32**, 1269-1280.

- 7) Bernard, B. F., Krenning, E. P., Breeman, W. A. P., Rolleman, E. J., Bakker, W. H., Visser, T. J., Mäcke, H., and de Jong, M. (1997) D-Lysine reduction of indium-111 octreotide and yttrium-90 octreotide renal uptake. *J. Nucl. Med.*, **38**, 1929-1933.
- 8) de Jong, M., Rolleman, E. J., Bernard, B. F., Visser, T. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., and Krenning, E. P. (1996) Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J. Nucl. Med.*, **37**, 1388-1392.
- 9) Duncan, J. R., Stephenson, M. T., Wu, H. P., and Anderson, C. J. (1997) Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res.*, **57**, 659-671.
- 10) Carone, F. A., Peterson, D. R., Oparil, S., and Pullman, T. N. (1979) Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int.*, **16**, 271-278.
- 11) Christensen, E. I., Rennke, H. G., and Carone, F. A. (1983) Renal tubular uptake of protein: Effect of molecular charge. *Am. J. Physiol.*, **244**, F436-F441.
- 12) Bianchi, C., Donadio, C., Tramonti, G., Auner, I., Lorusso, P., Deleide, G., Lunghi, F., and Salvadori, P. (1988) Renal handling of cationic and anionic small proteins: Experiments in intact rats. *Contr. Nephrol.*, **68**, 37-44.
- 13) Maack, T., Johnson, V., Kau, S. T., Figueiredo, J., and Sigulem, D. (1979) Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: A review. *Kidney Int.*, **16**, 251-270.
- 14) Imai, S., Morimoto, J., Tsubura, T., Esaki, K., Michalides, R., Holms, R. S., Deimling, O., and Higlgers, J. (1986) Genetic marker patterns and endogenous mammary tumor virus genes in inbred mouse strains in Japan. *Exp. Anim.*, **35**, 263-276.
- 15) Arano, Y., Mukai, T., Uezono, T., Wakisaka, K., Motonari, H., Akizawa, H., Taoka, Y., and Yokoyama, A. (1994) A biological method to evaluate bifunctional chelating agents to label antibodies with metallic radionuclides. *J. Nucl. Med.*, **35**, 890-898.
- 16) Arano, Y., Mukai, T., Akizawa, H., Uezono, T., Motonari, H., Wakisaka, K., Kairiyama, C., and Yokoyama, A. (1995) Radiolabeled metabolites of proteins play a critical role in radioactivity elimination from the liver. *Nucl. Med. Biol.*, **22**, 555-564.
- 17) Wallner, S. J. and Walker, J. E. (1975) Glycosidases in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits. *Plant Physiol.*, **55**, 93-98.

- 18) Razzell, W. E. (1963) Phosphodiesterases. *Method Enzymol.*, **6**, 236-258.
- 19) Albert, R., Miller, K., Chong, R., Hirth, W., Vanderheyden, J.-L., Deutsch, K., and Deutsch, E. (1992) Characterization of the two diastereomers of octreoscan-111, an In-111 labeled peptide for use in cancer imaging. *J. Nucl. Med.*, **33**, 900 (Abstract).
- 20) Hammond, P. J., Wade, A. F., Gwilliam, M. E., Peters, A. M., Myers, M. J., Gilbey, S. G., Bloom, S. R., and Calam, J. (1993) Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue. *Br. J. Cancer*, **67**, 1437-1439.
- 21) Lang, L., Jagoda, E., Wu, C., Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Pastan, I., Paik, C. H., Carrasquillo J. A., and Eckelman, W. C. (1997) Factors influencing the in vivo pharmacokinetics of peptides and antibody fragments: The pharmacokinetics of two PET-labeled low molecular weight proteins. *Q. J. Nucl. Med.*, **41**, 53-61.
- 22) Wu, C., Jagoda, E., Brechbiel, M., Webber, K. O., Pastan, I., Gansow, O., and Eckelman, W. C. (1997) Biodistribution and catabolism of Ga-67-labeled anti-Tac dsFv fragment. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 365-369.
- 23) Arano, Y., Mukai, T., Uezono, T., Motonari, H., Wakisaka, K., and Yokoyama, A. (1994) Biological comparison of DTPA and SCN-benzyl-EDTA as chelating agents for indium labeling of antibodies. *J. Labelled Compds. Radiopharm.*, **35**, 381-383.
- 24) Duncan, J. R. and Welch, M. J. (1993) Intracellular metabolism of indium-111-DTPA-labeled receptor targeted proteins. *J. Nucl. Med.*, **34**, 1728-1738.
- 25) Franano, F. N., Edwards, W. B., Welch, M. J., and Duncan, J. R. (1994) Metabolism of receptor targeted In-111-DTPA-glycoproteins: Identification of ¹¹¹In-DTPA-ε-lysine as the primary metabolic and excretory product. *Nucl. Med. Biol.*, **21**, 1023-1034.
- 26) Rogers, B. E., Franano, F. N., Duncan, J. R., Edwards, W. B., Anderson, C. J., Connett, J. M., and Welch, M. J. (1995) Identification of metabolites of ¹¹¹In-diethylenetriaminepentaacetic acid-monoclonal antibodies and antibody fragments in vivo. *Cancer Res.*, **55** (Suppl.), 5714-5720.

第 3 章 腎臓への放射能集積量を低減する ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体

これまでに示した検討結果は、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体投与後の腎臓における放射能滞留が、組織に取り込まれた後にリソソームで生成する ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体の高いリソソーム滞留性に依存し、その滞留性が N 末端アミノ酸に影響されないことを示唆した。そこで、 ^{111}In -DTPA-octreotide の腎臓への取り込みを抑制することが、腎臓への集積量の低減に結びつく有効な方法と考えられる。本章では、この腎臓への取り込み抑制の方法について検討した。

第 1 節 酸性アミノ酸の導入により負電荷を付与した ^{111}In -DTPA-octreotide の腎臓への集積量の低減

最近、D-、L-lysine を同時投与し、腎近位尿細管細胞の管腔側表面のカチオン結合部位をブロックすることにより、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の腎臓への集積量を低減できることが示された (1, 2)。このことは、正に帯電したペプチドと負に帯電した腎尿細管細胞表面との静電的相互作用が腎細胞への再吸収に大きな役割を担っていることを示唆する。実際に、最近、放射性標識された抗体フラグメントを化学的に修飾し等電点を低下させることにより、その腎臓への集積量が低減されたことが報告されている (3-5)。これらのことは、 ^{111}In -DTPA-octreotide の腎細胞への取り込みがその電氣的性質の修飾によって低減できることを示唆している。そこで、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide (Fig. 3-1) の N 末端アミノ酸残基の D-Phe を、負電荷を付与するために酸性アミノ酸である L-Asp に置換した誘導体 (^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide; Fig. 3-1) を合成し、その体内放射能挙動を、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide、および、側鎖に正電荷を持つ L-Lys、電荷を持たない L-Phe に置換した誘導体 (^{111}In -DTPA-L-^αLys¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide; Fig. 3-1) と比較検討した。

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

$^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-L-Asp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

$^{111}\text{In-DTPA-L-}^\alpha\text{Lys}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-L-Lys-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

$^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$:

$^{111}\text{In-DTPA-L-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol}$

Fig. 3-1 Structures of $^{111}\text{In-DTPA}$ -conjugated octreotide derivatives.

第 1 項 実験方法

試薬・機器

DTPA 結合 octreotide 誘導体のアミノ酸分析は、第 1 章に述べた方法と同様に行った。MALDI-TOFMS の測定は、第 2 章第 2 節と同様に行った。 $^{111}\text{In-DTPA}$ 結合ペプチドの逆相 HPLC には、第 2 章第 1 節と同様に、ナカライテスク社 Cosmosil 5C₁₈-MS (4.6 × 150 mm) を用い、移動相には 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) とメタノールを用い、流速 1.0 mL/min で、Table 3-1 に示すとおりメタノールを直線勾配で変化させた。電気的性質の検討以外での CAE では、Joko 社製セルロースアセテート膜 (Separax) を使用し、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ については、veronal 緩衝液 (イオン強度 0.08, pH 8.6) 中、0.8 mA/cm で、それぞれ、40、40、60 分間泳動し、 $^{111}\text{In-DTPA-L-}^\alpha\text{Lys}^1\text{-octreotide}$ については、リン酸緩衝液 (20 mM, pH 6.0) 中、0.8 mA/cm で 20 分間泳動した。 $^{111}\text{InCl}_3$ (2 mCi/mL) は日本メジフィジックス社より供給を受けた。その他の試薬にはすべて特級試薬を用いた。

Table 3-1 Reversed-phase HPLC gradient programs

¹¹¹ In-DTPA-D-Phe ¹ -octreotide	time (min)	0	15	25	50
	methanol (%)	5	5	55	55
¹¹¹ In-DTPA-L-Phe ¹ -octreotide	time (min)	0	15	25	50
	methanol (%)	5	5	60	60
¹¹¹ In-DTPA-L- ^α Lys ¹ -octreotide	time (min)	0	10	25	50
	methanol (%)	0	0	45	45
¹¹¹ In-DTPA-L-Asp ¹ -octreotide	time (min)	0	10	25	50
	methanol (%)	0	0	45	45

DTPA-octreotide 誘導体の合成

DTPA-L-Phe¹-octreotide、DTPA-L-Met¹-octreotide は、第 2 章第 2 節と同様に、mDTPA を使用して固相法により合成した。

DTPA-L-^αLys¹-octreotide は、N^α-Fmoc-Met-OH の代わりに N^α-Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて、DTPA-L-Met¹-octreotide と同様に合成した。

アミノ酸組成比: Thr × 1, 1.00; Phe × 1, 1.02; Lys × 2, 1.97. 質量分析 計算値: C₆₀H₉₁N₁₄O₁₉S₂ (MH⁺): *m/z* 1376.57. 測定値: 1376.56.

DTPA-L-Asp¹-octreotide は、N^α-Fmoc-Met-OH の代わりに N^α-Fmoc-Asp(^tBu)-OH を用いて、DTPA-L-Met¹-octreotide と同様に合成した。

アミノ酸組成比: Asp × 1, 0.78; Thr × 1, 1.09; Phe × 1, 1.18; Lys × 1, 1.00. 質量分析 計算値: C₅₈H₈₄N₁₃O₂₁S₂ (MH⁺): *m/z* 1363.48. 測定値: 1363.70.

DTPA-octreotide 誘導体の ¹¹¹In 標識

第 2 章第 1 節と同様に、10 μg の DTPA-D-Phe¹-octreotide、DTPA-L-Phe¹-octreotide、DTPA-L-^αLys¹-octreotide、または、DTPA-L-Asp¹-octreotide を含む ¹¹¹In 標識用キットを作製し、これに ¹¹¹InCl₃ (17.3 - 121.2 MBq) の 0.02 N HCl 溶液 (1 mL) を加えて標識した。電気的性質には、この溶液をそのまま用いた。また、血漿中安定性、および、in vivo 実験については、前節と同様、逆相 HPLC によって精製し、体内放射能分布実験に対しては 0.1 μg/ 100 μL、血清中安定性に対しては 0.1 μg/ 150 μL の DTPA-octreotide 誘導体を含む溶液を調製した。放射化学的純度は逆相 HPLC、CAE により求めた。

¹¹¹In-DTPA-octreotide 誘導体の電氣的性質

尿、および、血液中における ¹¹¹In-DTPA 結合 octreotide 誘導体の電氣的性質を比較するために、¹¹¹In-DTPA-octreotide 誘導体を CAE (Separax-SP, Joko 社) により分析した。尿、血液の pH に相当する pH 5.0、6.0、7.0、および、7.4 (尿: pH 5.0~7.4, 血液: pH 7.4) の 20 mM リン酸緩衝液を用い、60 分間、0.8 mA/cm で泳動した。

血漿中での安定性

それぞれの ¹¹¹In-DTPA-octreotide 誘導体の溶液 (1 μL, 1 ng, 45.2 - 71.7 kBq) を ddY 系雄性マウスの血漿 (400 μL) に加え、37 °C でインキュベートした後、第 2 章第 1 節と同様にして分析した。

In vivo 実験

体内放射能分布の実験は、第 2 章第 1 節と同様にして行った。また、投与直後から 24 時間後までに排泄された尿中の放射能を、第 2 章第 1 節と同様にして分析した。

第 2 項 結 果

¹¹¹In-DTPA-octreotide 誘導体の調製

逆相 HPLC、CAE により分析したところ、放射化学的純度はいずれも 95 % 以上であった。

¹¹¹In-DTPA 結合 octreotide 誘導体の電氣的性質

尿、血液中に相当する pH 5.0 ~ 7.4 の 20 mM リン酸緩衝液を用いた CAE の結果を Fig. 3-2 に示す。いずれの pH においても、¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide と ¹¹¹In-DTPA-L-Phe¹-octreotide の放射能が検出された位置は等しく、また、¹¹¹In-

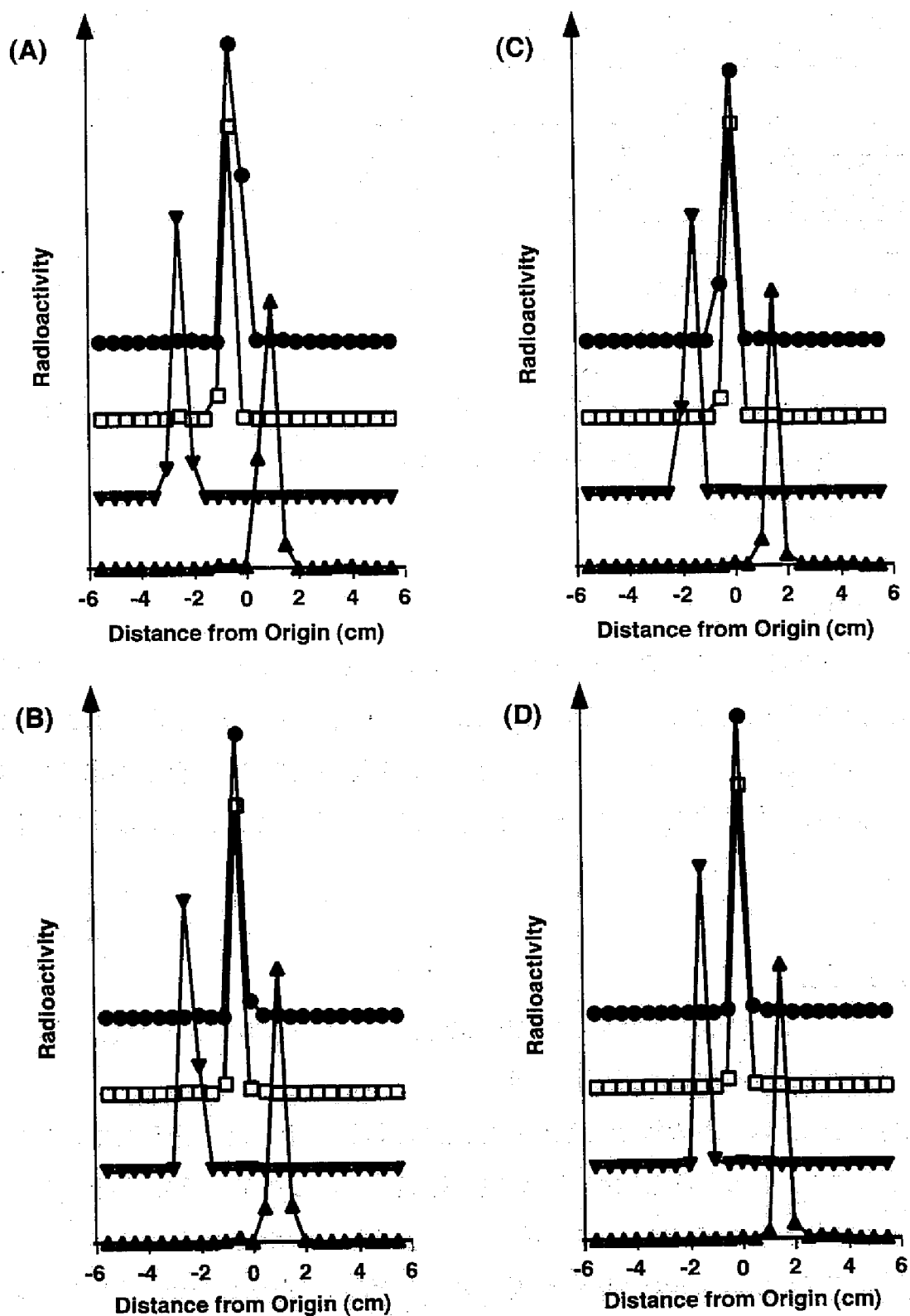


Figure 3-2. CAE radioactivity chromatograms of ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide (▲), ^{111}In -DTPA-L- α Lys¹-octreotide (▼), ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide (□), and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide (●) at pH 5.0 (A), pH 6.0 (B), pH 7.0 (C), and pH 7.4 (D).

Table 3-2 Percentage of intact ^{111}In -DTPA-conjugated octreotide derivatives after incubation in murine plasma^a

compounds	incubation time	
	1 h	3 h
^{111}In -DTPA-D-Phe ¹ -octreotide	96.17 (0.02)	95.51 (0.03)
^{111}In -DTPA-L-Phe ¹ -octreotide	96.40 (1.52)	96.51 (0.29)
^{111}In -DTPA-L- $^{\alpha}$ Lys ¹ -octreotide	99.15 (0.35)	98.47 (0.40)
^{111}In -DTPA-L-Asp ¹ -octreotide	99.96 (0.15)	99.55 (0.54)

^aDetermined by RP-HPLC analyses. Mean (s.d.) of three experiments.

DTPA-L- $^{\alpha}$ Lys¹-octreotide、および、 ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide は、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide、 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide と比べ、それぞれ、陰極側、および、陽極側に移動した。

血漿中安定性

Table 3-2 には、37 °C でマウス血漿中においてインキュベートし、1、3 時間後に存在する未変化の ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の割合を逆相 HPLC により分析した結果をまとめた。いずれの場合も、3 時間後で 95 % 以上が未変化体として存在し、血漿中で安定であった。同様の結果が CAE 分析によっても得られた。

In vivo 実験

Fig. 3-3 に、マウスに投与して 10、30 分、1、3、6 時間後の血液、肝臓、腎臓、腸管における放射能集積量を示す。

血液では、いずれの場合も速やかな放射能消失を示した。腎臓では、いずれの誘導体も、他の臓器と比べて高い放射能集積を示したが、その集積量に N 末アミノ酸残基の相違により大きな相違が認められた。 ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide は ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と同様の放射能集積量を示したが、 ^{111}In -DTPA-L- $^{\alpha}$ Lys¹-octreotide は投与 30 分以降において、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比べ有意に高い集積を示した ($p < 0.05$)。これに対して、 ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide では、投与 10 分以降で腎臓の放射能集積量が ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide と比

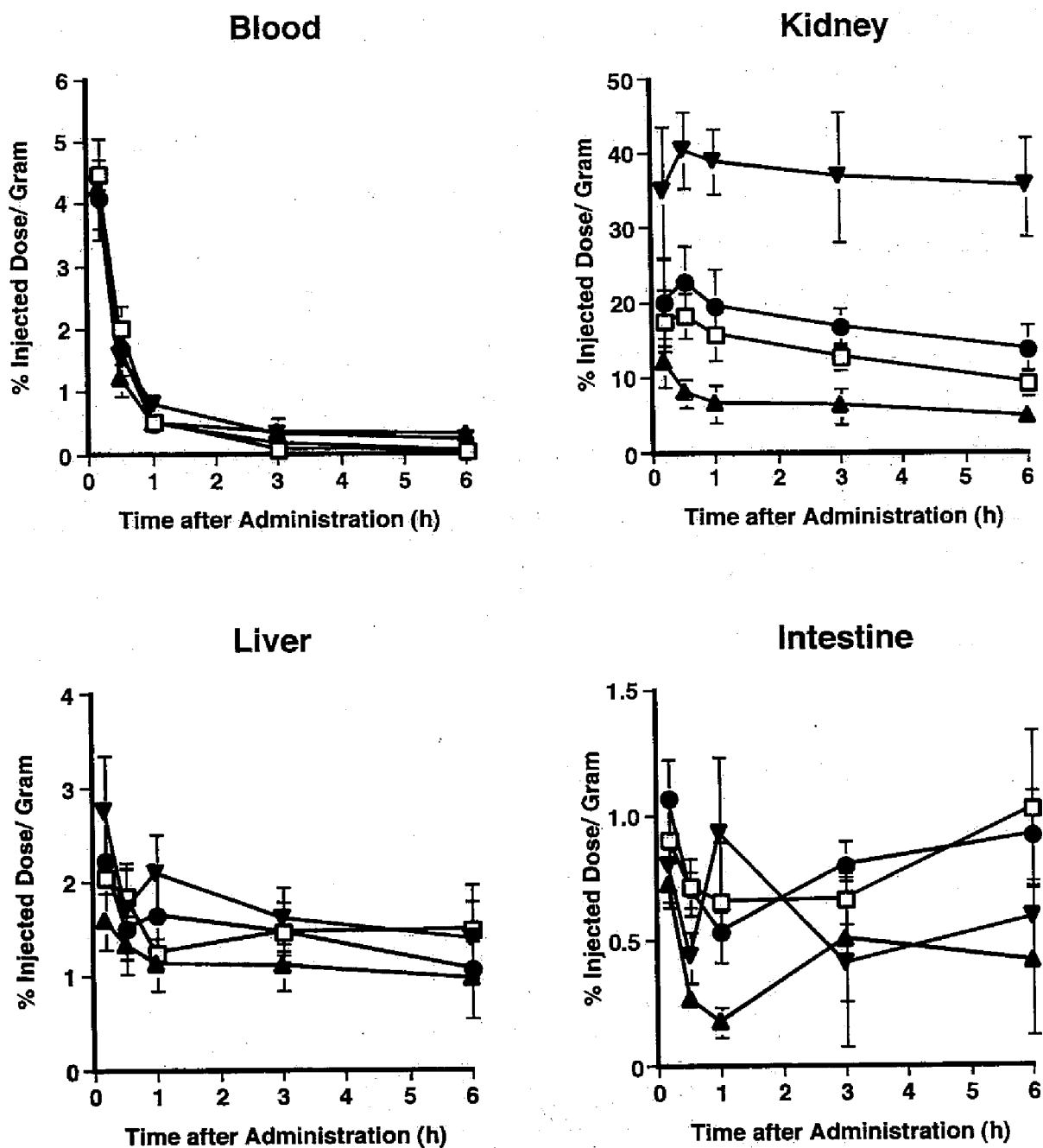


Figure 3-3. Biodistribution of radioactivity after administration of ¹¹¹In-DTPA-L-Asp¹-octreotide (▲), ¹¹¹In-DTPA-L-αLys¹-octreotide (▼), ¹¹¹In-DTPA-L-Phe¹-octreotide (□), and ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide (●) in normal mice.

¹¹¹In-DTPA-L-Asp¹-octreotide showed significantly lower renal radioactivity levels than those of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide from 10 min postinjection onward ($p < 0.05$), whereas ¹¹¹In-DTPA-L-αLys¹-octreotide showed significantly higher renal radioactivity levels than those of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide from 30 min postinjection onward ($p < 0.05$). Significance was determined by unpaired Student t -test.

べて有意に低かった ($p < 0.05$)。肝臓の放射能集積量は、いずれのペプチドでも、腎臓と比べて低く、いずれの場合も 1~3 % injected dose/ g 程度であった。とりわけ $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ は、肝臓で最も低い集積を示した。また、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ の腸管における放射能集積量は他の誘導体と比べて高い傾向が見られたが、いずれの誘導体でも、腎臓と比べて低い値を示し、約 1 % injected dose/ g 以下であった。

Fig. 3-4 には、マウスに投与後 24 時間の尿、糞便中に排泄された累積放射能量を示す。 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ 、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ の尿への排泄量は他の誘導体と比べて低く、糞便中への排泄量は高かったが、いずれの場合も放射能は主に尿中に排泄された。また、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ が最も高い尿中排泄量を示した。

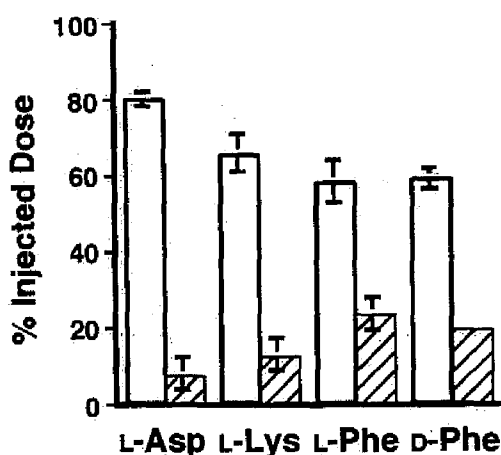


Figure 3-4. Cumulative radioactivity in the urine (open column) and feces (hatched column) for 24 h postinjection of the four $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ derivatives in normal mice. L-Asp, L-Lys, L-Phe, and D-Phe represent $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$, $^{111}\text{In-DTPA-L-}^{\alpha}\text{Lys}^1\text{-octreotide}$, $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$, and $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$, respectively.

$^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ demonstrated significantly higher radioactivity levels in the urine than those of the other three $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ derivatives ($p < 0.05$). $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ demonstrated significantly lower radioactivity levels in the feces than those of the other three $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ derivatives ($p < 0.05$). Significance was determined by unpaired Student *t*-test.

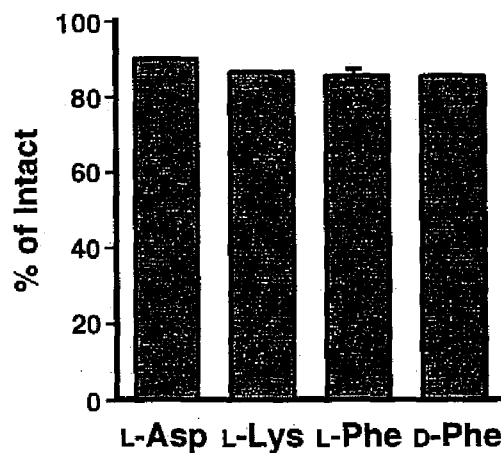


Figure 3-5. Proportion of the intact peptides in the urine by 24 h postinjection of ^{111}In -DTPA-octreotide derivatives into normal mice, as determined by reversed-phase HPLC. L-Asp, L-Lys, L-Phe, and D-Phe represent ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide, ^{111}In -DTPA-L- α Lys¹-octreotide, ^{111}In -DTPA-L-Phe¹-octreotide, and ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide, respectively. Columns and bars show means and s.d. for three experiments. While over 85 % of the radioactivity in the urine were detected as their intact forms for the four ^{111}In -DTPA-conjugated peptides, ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide showed significantly higher radioactivity as intact form in the urine when compared with the other three ^{111}In -DTPA-octreotide derivatives ($p < 0.05$). Significance was determined by unpaired Student *t*-test.

Fig. 3-5 には、投与 24 時間後までに排泄された尿中の放射能のうち、未変化体が占める割合をまとめた。逆相 HPLC により分析したところ、いずれの場合も尿中に排泄された放射能の 85 % 以上が未変化体であった。最も未変化体の割合が高かったのは ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide であった ($p < 0.05$)。

第 3 項 考 察

蛋白質の腎尿細管細胞への再吸収においては、その荷電状態が重要な役割を担っている (6-8)。蛋白質分子内での電荷の分布状態も尿細管細胞の管腔側膜との結合とそれに引き続いて起こるエンドサイトーシスにおいて重要な要素と考えられている (7)。ところで、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの場合、負に帯電した ^{111}In -DTPA は一般に、そのかさ高さのために、ペプチド分子の中で生理作用にもっとも影響を与えない位置に導入されることから、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの電荷分布はしばしば不均一になると考えられる。実際、本研究で用いた

$^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ の場合、受容体との結合親和性が保存されていることから、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 部分は正に帯電した受容体との結合部位 (9) と離れた位置に存在していると考えられる。そこで、本章では、不均一な電荷分布を与える電氣的性質の修飾によって $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ の腎臓への集積量を低減させるために、負電荷を付与することを目的として $^{111}\text{In-DTPA}$ 部分の隣に位置する $octreotide$ の N 末端アミノ酸残基を酸性アミノ酸に置換した $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体を合成し、その体内放射能動態を、他の電氣的性質を有するアミノ酸に置換した誘導体と比較検討した。

CAE による分析結果から、N 末端として導入されたアミノ酸残基の電氣的性質は、生成した $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ の尿中、血液中の pH における正味の電氣的性質を変えることを認めた。即ち、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ と $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ は同等の電氣的性質を示し、それらと比べて $^{111}\text{In-DTPA-L-}^o\text{Lys}^1\text{-octreotide}$ はより正に、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ はより負に帯電していた (Fig. 3-2)。

マウスに投与したところ、検討した $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体はすべて、速やかな血液中からの放射能消失を示した (Fig. 3-3)。いずれの誘導体もマウス血漿中で非常に安定であったことから (Table 3-2)、これらの $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体は未変化体のまま臓器などに移行すると考えられる。 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ と $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ は、他の誘導体と比べて僅かに高い胆汁排泄性を示したが、いずれの場合も放射能は主に未変化体として尿中に排泄され (Figs. 3-4, 3-5)、また、肝臓や腸管と比べて腎臓において非常に高い放射能が集積した。しかしながら、腎臓での放射能集積量には誘導体間で明確な相違が観察された (Fig. 3-3)。即ち、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ と $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^1\text{-octreotide}$ は同等の放射能集積を示したが、より正に帯電した $^{111}\text{In-DTPA-L-}^o\text{Lys}^1\text{-octreotide}$ は、投与早期から他の誘導体と比べて有意に高い放射能集積量を示し、より負に帯電した $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ は有意に低い放射能集積量を示した (Fig. 3-3)。

以上の結果は、 $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ の正味の電氣的性質が糸球体濾過後の再

吸収において大きな役割を担っており、負電荷の付与が腎臓への集積量を低減したことを示している。したがって、負電荷の導入が、標的組織での放射能集積量を損なうことなく腎臓での放射能集積を低減した ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの開発の新しい有効な方法となり得るものと考えられる。近年、核医学画像診断、内部照射治療を目的としたペプチドを母体化合物とする放射性薬剤の開発が盛んに行われているが (10-22)、優れた画像診断、治療を達成する様々な ^{111}In -DTPA 結合ペプチドを開発するためには、今後、導入する負電荷の種類、負電荷の導入部位と体内分布、受容体との親和性、標的部位への移行性との間の関連を系統的に検討することが有効であろう。さらに、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドについて得られた成果は、 ^{111}In -DTPA 以外の水溶性の高い放射性金属キレートを用いた腎排泄性の高いペプチド放射性薬剤の設計に対しても有用な知見を与えるものと考えられる。

以上、本章では、再吸収においてペプチド分子の正電荷と刷子縁膜の負電荷との静電的相互作用が関与している可能性に注目し、N 末端アミノ酸残基を酸性アミノ酸である L-Asp に置換することにより負電荷を付与した ^{111}In -DTPA-L-Asp¹-octreotide を合成し、腎臓への放射能集積量の低減を試みた。その結果、N 末端が中性、塩基性アミノ酸である誘導体と比べ有意に低い腎放射能集積量を示し、負電荷の付与が、 ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの標的組織への放射能集積量を損なうことなく腎臓への放射能集積を低減する有効な方法となり得ることが明らかとなった。この成果は、今後のペプチド放射性薬剤の開発に有用な知見を与えるものと期待される。

引用文献

- 1) Bernard, B. F., Krenning, E. P., Breeman, W. A. P., Rolleman, E. J., Bakker, W. H., Visser, T. J., Mäcke, H., and de Jong, M. (1997) D-Lysine reduction of indium-111 octreotide and yttrium-90 octreotide renal uptake. *J. Nucl. Med.*, **38**, 1929-1933.
- 2) de Jong, M., Rolleman, E. J., Bernard, B. F., Visser, T. J., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., and Krenning, E. P. (1996) Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J. Nucl. Med.*, **37**, 1388-1392.
- 3) Kim, I. S., Yoo, T. M., Kobayashi, H., Kim, M. K., Le, N., Wang, Q. C., Pastan, I., Carrasquillo, J. A., and Paik, C. H. (1999) Chemical modification to reduce renal uptake of disulfide-bonded variable region fragment of anti-Tac monoclonal antibody labeled with ^{99m}Tc . *Bioconjugate Chem.*, **10**, 447-453.
- 4) Kobayashi, H., Kim, I.-S., Drumm, D., Kim, M.-K., Paik, D. S., Le, N., Waldmann, T. A., Carrasquillo, J. A., and Paik, C. H. (1999) Favorable effects of glycolate conjugation on the biodistribution of humanized antiTac Fab fragment. *J. Nucl. Med.*, **40**, 837-845.
- 5) Kobayashi, H., Le, N., Kim, I.-S., Kim, M.-K., Pie, J.-E., Drumm, D., Paik, D. S., Waldmann, T. A., Paik, C. H., and Carrasquillo, J. A. (1999) The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points. *Cancer Res.*, **59**, 422-430.
- 6) Carone, F. A., Peterson, D. R., Oparil, S., and Pullman, T. N. (1979) Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int.*, **16**, 271-278.
- 7) Christensen, E. I., Rennke, H. G., and Carone, F. A. (1983) Renal tubular uptake of protein: Effect of molecular charge. *Am. J. Physiol.*, **244**, F436-F441.
- 8) Wall, D. A., Maack, T. (1985) Endocytic uptake, transport, and catabolism of proteins by epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**, C12-C20.
- 9) Veber, D. F., Freidinger, R. M., Perlow, D. S., Paleveda Jr., W. J., Holly, F. W., Strachan, R. G., Nutt, R. F., Arison, B. H., Homnick, C., Randall, W. C., Glitzer, M. S., Saperstein, R., and Hirschmann, R. (1981) A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin. *Nature*, **292**, 55-58.
- 10) Bagutti, C., Stolz, B., Albert, R., Bruns, C., Pless, J., and Eberle, A. N. (1994) [^{111}In]-DTPA-labeled analogues of α -melanocyte-stimulating hormone for melanoma targeting: Receptor binding *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, **58**, 749-

- 11) Bakker, W. H., Albert, R., Bruns, C., Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., Marbach, P., Pless, J., Pralet, D., Stolz, B., Koper, J. W., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1991) [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci.*, **49**, 1583-1591.
- 12) Bard, D. R., Knight, C. G., and Page-Thomas, D. P. (1990) A chelating derivative of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential imaging agent for malignant melanoma. *Br. J. Cancer*, **62**, 919-922.
- 13) Behr, T. M., Jenner, N., Béhé, M., Angerstein, C., Gratz, S., Raue, F., and Becker, W. (1999) Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J. Nucl. Med.*, **40**, 1029-1044.
- 14) Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., van der Pluijm, M., van Koetsveld, P. M., de Jong, M., Setyono-Han, B., Bakker, W. H., Kwekkeboom, D. J., Visser, T. J., Lamberts, S. W. J., and Krenning, E. P. (1994) A new radiolabelled somatostatin analogue [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]RC-160: Preparation, biological activity, receptor scintigraphy in rats and comparison with [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide. *Eur. J. Nucl. Med.*, **21**, 328-335.
- 15) Breeman, W. A. P., van Hagen, M. P., Visser-Wisselaar, H. A., van der Pluijm, M. E., Koper, J. W., Setyono-Han, B., Bakker, W. H., Kwekkeboom, D. J., Hazenberg, M. P., Lamberts, S. W. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1996) In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [^{111}In -DTPA-Arg 1]substance P. *J. Nucl. Med.*, **37**, 108-117.
- 16) Breeman, W. A. P., Hofland, L. J., de Jong, M., Bernard, B. F., Srinivasan, A., Kwekkeboom, D. J., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1999) Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy. *Int. J. Cancer*, **81**, 658-665.
- 17) de Jong, M., Bakker, W. H., Breeman, W. A. P., Bernard, B. F., Hofland, L. J., Visser, T. J., Srinivasan, A., Schmidt, M., Béhé, M., Mäcke, H. R., and Krenning, E. P. (1998) Pre-clinical comparison of [DTPA 0] octreotide, [DTPA 0 , Tyr 3] octreotide and [DOTA 0 , Tyr 3] octreotide as carriers for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer*, **75**, 406-411.
- 18) Fischman, A. J., Pike, M. C., Kroon, D., Fucello, A. J., Rexinger, D., tenKate, C.,

- Wilkinson, R., Rubin, R. H., and Strauss, H. W. (1991) Imaging focal sites of bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl. Med.*, **32**, 483-491.
- 19) Lastoria, S., Palmieri, G., Muto, P., and Lombardi, G. (1999) Functional imaging of thymic disorders. *Ann. Med.*, **31** (Suppl. 2), 63-69.
- 20) Mokotoff, M., Swanson, D. P., Jonnalagadda, S. S., Epperly, M. W., and Brown, M. L. (1997) Evaluation of laminin peptide fragments labeled with indium-111 for the potential imaging of malignant tumors. *J. Peptide Res.*, **49**, 510-516.
- 21) Breeman, W. A. P., de Jong, M., Bernard, B. F., Hofland, L. J., Srinivasan, A., van der Pluijm, M. E., Bakker, W. H., Visser, T. J., and Krenning, E. P. (1998) Tissue distribution and metabolism of radioiodinated DTPA⁰, D-Tyr¹ and Tyr³ derivatives of octreotide in rats. *Anticancer Res.*, **18**, 83-90.
- 22) Virgolini, I., Raderer, M., Kurtaran, A., Angelberger, P., Yang, Q., Radosavljevic, M., Leimer, M., Kaserer, K., Li, S. R., Körnek, G., Hübsch, P., Niederle, B., Pidlich, J., Scheithauer, W., and Valent, P. (1996) ¹²³I-vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor scanning: Update of imaging results in patients with adenocarcinomas and endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 685-692.

結 語

本研究では、核医学画像診断、内部照射治療を目的とする ^{111}In -DTPA 結合ペプチドの開発への貢献を目的として、DTPA のペプチドへの効率のよい導入法と ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体投与後の非特異的な腎臓での放射能集積の低減法について検討し、以下に示す知見を得た。

1. 従来の DTPA のペプチドへの導入法では、二つの環状酸無水物構造を持つ cDTPA が使用され、分子間架橋結合を形成するために反応収率の低下を招いたことから、DTPA をペプチドへ効率よく導入するには、反応部位をただ一つのみ有する DTPA を用いるのが有効と考え、DTPA の五個のカルボキシル基のうち、端の一つのカルボキシル基を遊離の状態とし、他のカルボキシル基が $t\text{Bu}$ 基で保護された mDTPA を開発した。さらに、mDTPA を固相ペプチド合成に適用することにより、効率よく DTPA をペプチドに導入することに成功した。これにより、cDTPA を用いた従来の方法と比べ、DTPA 結合ペプチドの合成収率を大幅に向上することができた。

2. ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide 投与後に腎臓に集積した放射能を分析した結果、放射能の滞留には、リソソームにおける緩徐な代謝速度と代謝物 ^{111}In -DTPA-D-Phe の腎細胞リソソームにおける高い滞留性が関与することを見いだした。そこで、代謝速度を増加すること、最終的な放射性代謝物のリソソーム滞留性を低減することにより、腎臓での放射能滞留を低減することを考え、N 末端の D-Phe を数種の L-アミノ酸に置換した ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体を合成し、その体内動態を検討した。その結果、これらの誘導体は ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide よりも代謝速度は増加したが、腎臓での放射能滞留はほとんど変わらないことを認めた。これらの結果から、 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体投与後の腎臓における放射能滞留は、主としてリソソーム代謝で生成する ^{111}In -DTPA と N 末端アミノ酸との結合体の高いリソソーム滞留性に基づくもので、N 末端アミノ酸部分

にはほとんど影響を受けないことを見いだした。

3. 腎臓での非特異的な放射能集積を低減するには腎臓への取り込みを抑制することが有効であると考え、腎尿細管細胞表面での静電的相互作用が腎細胞への薬物の吸収に重要であることに着目し、N 末端を酸性アミノ酸 L-Asp に置換して負電荷を付与した $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ を合成した。そして、その体内動態を、N 末端を中性、塩基性のアミノ酸に置換して中性および正電荷を付与した $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$ 誘導体と比較、検討した結果、中性および正電荷を付与した誘導体と比べ、 $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1\text{-octreotide}$ では腎臓への放射能集積量が有意に低減し、負電荷の導入が腎臓への放射能集積量の低減に有効な方法であることを見いだした。

以上、著者は、 $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ において、キレート形成部位である DTPA の効率よい導入方法を開発するとともに、腎臓での非特異的な放射能集積を低減させる方法を見いだした。これらの研究成果は、今後のペプチド放射性薬剤の開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

謝 辞

本研究の終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授並びに横山 陽 名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究において懇切なる御指導と御教示を戴きました千葉大学大学院薬学研究科 荒野 泰 教授、岡山大学薬学部 斎藤 寛 教授に心から感謝の意を表します。

また、本研究全般にわたり、多くの有益な御助言を戴きました京都大学大学院医学研究科 向 高弘 助手、京都大学大学院薬学研究科 間賀田 泰寛 助教授、ホリウチ・スズキ・カズコ 助手、京都大学大学院医学研究科 飯田 靖彦 助手、京都薬科大学 木曾 良明 教授、藤原 洋一 助手、木村 徹 助手、大阪大学蛋白質研究所 赤路 健一 助教授、岡山大学薬学部 御船 正樹 助教授、岩藤 章正 助手、福井医科大学 藤林 靖久 教授、京都府立医科大学 清野 泰 助手にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

更に実験を進めるに当たり御助言と御協力を戴きました住友製薬株式会社 脇坂 孝治 博士、旭川医科大学 上園 崇 助手、大塚製薬株式会社 元成 裕司 修士、参天製薬株式会社 塩野 浩光 修士、滋賀県立成人病センター 研究所 杉本 幹治 修士、共に実験を進め、御協力を戴きました長崎大学薬学部 小野 正博 助手、藤岡 泰 修士、千葉大学大学院薬学研究科 上原 知也 助手、小川 数馬 修士、難波 伸二 修士、川亦 敦子 学士、中山 真作 修士、大西 直角 修士、討論に参加して戴きました京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野の方々、京都薬科大学薬品化学教室の方々、岡山大学薬学部薬品分析学講座の方々、質量分析を施行して戴きました秋元 茂文 博士、京都薬科大学 織田 佳代子 助手、松本 光 博士、NMR 測定を施行して戴きました赤路 眞佐子 修士、元素分析を施行して戴きました京都大学微量元素分析センターの方々、放射性同位元素を提供して戴きました日本メジフィジックス社にそれぞれ深く感謝いたします。